



Régulation androgénique du microARN miR-135a et implication dans la progression tumorale prostatique

Auriane Kroiss

► To cite this version:

Auriane Kroiss. Régulation androgénique du microARN miR-135a et implication dans la progression tumorale prostatique. Biologie moléculaire. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2013. Français. NNT : 2013ENSL0834 . tel-00965286

HAL Id: tel-00965286

<https://theses.hal.science/tel-00965286>

Submitted on 25 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon

Discipline : Sciences de la Vie

Laboratoire Génomique fonctionnelle des récepteurs nucléaires de l'Institut de Génomique
Fonctionnelle de Lyon (IGFL)

École Doctorale Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

présentée et soutenue publiquement le 24 Septembre 2013

par Madame Auriane KROISS

Régulation androgénique du microARN miR-135a
et implication dans la progression tumorale prostatique

Thèse encadrée par Mme Nathalie ALLIOLI et dirigée par M. Jacques SAMARUT

Après l'avis de : M. Marc BILLAUD et M. Stéphan VAGNER

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Nathalie ALLIOLI, Université Claude Bernard Lyon 1, Membre

M. Marc BILLAUD, Université Joseph Fourier Grenoble, Rapporteur

M. Jocelyn CERAILINE, Université de Strasbourg, Membre

M. Jacques SAMARUT, ENS de Lyon, Directeur

M. Stéphan VAGNER, Université Paris Sud-11, Rapporteur

M. Jean-Marc VANACKER, ENS de Lyon, Membre

ADRESSES :

Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon

ENS de Lyon - CNRS UMR 5242

46, allée d'Italie

69364 Lyon cedex 07

Adresse du laboratoire où la thèse a été préparée :

Centre Hospitalier Lyon Sud, Bâtiment Faculté de Médecine

165, chemin du grand Revoyet

69600 OULLINS

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse, Jacques SAMARUT, pour m'avoir accueillie et permis de préparer une thèse dans son laboratoire. C'est un réel honneur d'avoir pu travailler avec vous.

Je souhaite tout particulièrement remercier Nathalie ALLIOLI, qui m'a encadrée depuis mon master 2 jusqu'à la fin de ma thèse. Tu m'as presque tout appris dans ce métier, depuis la réalisation des manipulations jusqu'à la retranscription des résultats en communications orales ou écrites, et je t'en suis très reconnaissante. Je te remercie pour ta pédagogie mais aussi pour ta patience, ta rigueur et ta volonté, que tu as su me transmettre. Je te remercie pour ton implication dans ce projet et pour toute l'énergie que tu as dépensée à le faire avancer. Enfin, je te remercie pour ta confiance qui m'a permis d'acquérir une certaine indépendance.

La réalisation de ce projet n'aurait pas été la même sans Séverine VINCENT. Je te remercie pour tout le travail que tu as fourni dans cette étude ainsi que pour tout ce que tu m'as apportée. Tu m'as formée à de nombreuses techniques et tu m'as appris beaucoup de choses dans la vie du laboratoire. J'espère pouvoir devenir un jour aussi organisée que toi. Merci pour ta gentillesse, ton soutien et pour ton aide précieuse durant toutes ces épreuves. Nos longues discussions d'entre-paillasse vont me manquer. Je te remercie pour tous ces moments scientifiques passés ensemble mais aussi pour tous les autres (soirées cinéma/m&m's, boissons au concombre, après gâteaux et vide-grenier sous la pluie).

Je tiens également à remercier tous les autres membres de l'équipe, passés et présents et plus particulièrement ceux que j'ai pu côtoyer à Lyon Sud et qui ont participé de près ou de loin à ce projet : Virginie VLAEMINCK-GUILLEM, Anne-Marie BIROT, Myriam DECAUSSIN-PETRUCCI, Alain RUFFION, Emmanuel COMBE, Juliette LE DOUCE et Nicolas BEDEL. Merci Virginie et Anne-Marie pour votre soutien scientifique ainsi que pour votre gentillesse et votre bonne humeur quotidiennes. Votre départ s'est fait ressentir et les cours avec toi Virginie ont été un réel plaisir. Merci Myriam et Alain pour la collecte des tissus prostatiques et des informations clinico-pathologiques. Merci aussi à Myriam pour l'analyse des lames.

En dehors de l'équipe, je tiens à remercier Emmanuelle MEUGNIER et Frédéric CHALMEL pour l'analyse des puces et Julien DUGAS pour les analyses statistiques. Je

remercie également Christophe CHAMOT et Claire LIONNET du PLATIM pour m'avoir appris à utiliser le Time Laps et à analyser les données. Enfin, je remercie Céline MICHAUX, Karine CASTELLANO et Béatrice BANCEL, pour leur aide technique dans la préparation des échantillons de patients et pour la réalisation des IHC.

Je souhaite aussi remercier les membres de l'IGFL que j'ai pu rencontrer et avec qui j'ai pu interagir. En particulier, j'aimerais remercier Jean-Marc VANACKER ainsi que les membres de son équipe pour les discussions que nous avons pu avoir sur le projet, la mise au point des immunofluorescences, les constructions avec la 3'UTR de ESRRA et le don de certains réactifs (Y27632 et phalloïdine).

Je remercie les membres du jury Marc BILLAUD, Stéphan VAGNER, Jocelyn CERLINE et Jean-Marc VANACKER pour avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie également Laura CORBO et Jocelyn CERLINE pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Merci pour vos conseils et pour vos encouragements.

Je remercie toutes les personnes que j'ai rencontrées durant cette thèse et avec qui j'ai passé de très bons moments.

Merci à Mmes BAIN et Federica CALEVRO pour m'avoir guidée jusqu'ici.

Enfin, pour finir, je souhaite remercier ma famille qui m'a toujours soutenue dans toutes les épreuves de la vie. Merci à mes parents pour m'avoir permis d'atteindre ce niveau d'étude, pour m'avoir encouragée dans mes choix et pour m'avoir aidée dès que vous le pouviez. Merci à ma sœur pour tous tes messages de soutien et pour avoir été à mes côtés dès que j'en avais besoin. Merci à Alex pour m'avoir supportée au quotidien, merci d'avoir passé des soirées/nuits et week-end avec moi au labo et de m'avoir épaulée tout ce temps. Merci à vous d'avoir cru en moi jusqu'au bout.

RESUME

La voie de signalisation des androgènes, à travers le récepteur aux androgènes (AR), joue un rôle important dans le développement et la fonction de la prostate, ainsi que dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate. La découverte de nouveaux effecteurs de la signalisation androgènes-AR permettra une meilleure compréhension de ces mécanismes.

MiR-135a a été identifié comme un gène cible de la voie de signalisation androgènes-AR. Après stimulation androgénique, AR active directement la transcription du gène *miR-135a2*, en se fixant sur un élément de réponse aux androgènes dans la région promotrice.

Une surexpression de miR-135a inhibe la migration et l'invasion de cellules prostatiques cancéreuses, en régulant négativement l'expression des protéines ROCK1 et ROCK2, deux gènes cibles de miR-135a nouvellement identifiés.

De plus, miR-135a cible et régule négativement l'expression du facteur de transcription FOXN3, capable de moduler l'activité transcriptionnelle de AR et la prolifération cellulaire dépendante des androgènes.

L'étude fonctionnelle de miR-135a suggère donc qu'il puisse être impliqué dans la progression du cancer de la prostate, en régulant la formation des métastases et la signalisation androgénique.

L'expression de miR-135a, dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain adjacent, de prostatectomies de patients, est inversement corrélée aux paramètres d'agressivité de la maladie, suggérant qu'il puisse être utilisé comme marqueur de pronostic du cancer de la prostate.

Ces résultats font de miR-135a un nouvel effecteur de la voie de signalisation de AR, pouvant contribuer à la progression du cancer de la prostate.

Mots clés : microARN, miR-135a, cancer de la prostate, récepteur aux androgènes, ROCK1, ROCK2, FOXN3.

ABSTRACT

Androgens signaling through the androgen receptor (AR) is critical for normal prostate development and function, as well as prostate cancer initiation and progression. The discovery of new effectors of androgens-AR pathway will allow a better understanding of these mechanisms.

MiR-135a has been identified as a target gene in androgen-AR signaling pathway. After androgen stimulation, AR directly activates the transcription of miR-135a2 gene by binding to an androgen response element in the promoter region.

Ectopic expression of miR-135a was found to induce morphological modification leading to an inhibition of migration and invasion in prostate cancer cells, by down-regulating ROCK1 and ROCK 2 expression, two newly identified miR-135a target genes.

Moreover, miR-135a targets and downregulates the expression of the transcription factor FOXN3, able to modulate AR transcriptional activity and androgen-mediated cell proliferation.

Thus, functional study of miR-135a suggests that it could be implicated in prostate cancer progression, by regulating metastases formation and androgen signaling.

MiR-135a expression level in surgical cancerous specimens normalized to pair-matched normal counterpart tissues was inversely correlated with aggressivity parameters of the disease, suggesting that it could be used as a candidate prognostic marker in human prostate cancer.

These results define miR-135a as a novel effector in androgens-AR signaling, which may contribute to prostate cancer progression.

Key words: microRNA, miR-135a, prostate cancer, androgen receptor, ROCK1, ROCK2 FOXN3.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
RESUME.....	5
ABSTRACT	6
TABLE DES MATIERES.....	7
INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX	11
ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION.....	17
I. Les androgènes.....	17
1. Biosynthèse, transport et métabolisme des androgènes	17
2. Le récepteur aux androgènes (AR)	19
a- Structure et domaines fonctionnels de AR	19
b- Action génomique des androgènes via AR.....	22
• Mécanisme d'action de AR	22
• Eléments de réponse aux androgènes	24
• Interaction avec les cofacteurs et facteurs de transcription	26
3. Actions non-génomiques des androgènes.....	27
II. Le cancer de la prostate.....	29
1. La prostate.....	29
a- Anatomie et fonction	29
b- Histologie et cytologie	30
c- Pathologies prostatiques	32
2. Le cancer de la prostate (CaP)	32
a- Epidémiologie.....	32
b- Etiologie et origine du CaP.....	34
c- Dépistage, détection et diagnostic du CaP.....	35
d- Classification et valeur pronostique.....	36
• Stades TNM.....	36
• Score de Gleason	38

• Classification de D'Amico	39
3. Traitements du CaP	40
a- Surveillance active	40
b- Chirurgie	40
c- Radiothérapie	41
d- Nouvelles thérapeutiques locales	41
e- Hormonothérapie	41
f- Chimiothérapie	42
4. Evolution du CaP	42
a- Rechute des cancers localisés	43
b- Echappement hormonal	43
5. Mécanismes du développement du cancer de la prostate résistant à la castration	44
a- Réactivation de AR	44
• Augmentation de l'expression de AR / amplification de AR	44
• Altérations dans la spécificité de liaison ou l'accrochage du ligand	46
• Altérations dans le recrutement des cofacteurs	46
• Activation de AR par d'autres voies de transduction du signal	47
b- Métabolisme androgénique	47
III. Les microARNs	49
1. Biogenèse des miARNs	49
a- Organisation génomique - Gènes miR	49
b- Transcription des gènes miR : les pri-miARNs	50
c- Clivage du pri-miARN en pré-miARN	51
d- Export du pré-miARN vers le cytoplasme	52
e- Formation du miARN mature	52
f- Formation du complexe miRISC	53
2. Nomenclature	54
3. Mécanisme d'action et fonction des miARNs	56
a- Reconnaissance de la cible	56
• Liaison miARN – ARNm	56
• Localisation de l'interaction miARN - ARNm	58
• Outils informatiques pour la recherche de cibles de miARNs	59
b- Régulation de l'expression des gènes cibles par les miARNs	60
c- Fonction biologique des miARNs	63
4. Régulation de l'expression des microARNs	63
a- Régulation au niveau transcriptionnel	63
b- Régulation au niveau post-transcriptionnel	64
IV. miARNs et cancer de la prostate	66
1. miARNs comme biomarqueurs potentiels du CaP	66
a- Signature d'expression des miARNs dans le tissu tumoral	66
• miARNs comme marqueurs potentiels du CaP	66
• miARNs comme marqueurs potentiels de la progression du CaP	69
b- Valeur pronostique de l'expression des miARNs dans le CaP	72

c- miARNs circulants.....	72
2. Rôle de certains miARNs dans la tumorigenèse prostatique et la progression tumorale ..	73
a- miARNs suppresseurs de tumeur dans le CaP.....	74
• miR-15a et miR-16.....	75
• Famille miR-133.....	75
• miR-143 et miR-145.....	76
• Famille miR-200.....	76
• Famille let-7.....	77
• miR-203 et miR-205.....	77
• Famille miR-34.....	78
• Autres miARNs suppresseurs de tumeur.....	79
b- OncomiRs dans le CaP	80
• miR-21	81
• miR-32 et miR-148a	82
• miR-125b.....	82
• miR-221 et miR-222.....	83
• Autres oncomiRs	83
c- miARNs et cellules souches du CaP.....	84
3. Utilisation des miARNs dans la thérapie cancéreuse	85
4. Conclusion	87
 PRESENTATION DU PROJET	 89
I. Contexte de l'étude	89
II. Objectifs	90
 RESULTATS	 91
I. miR-135a, un miARN androgéno-régulé.....	91
1. Identification de miR-135a comme miARN androgéno-régulé.....	91
2. AR régule l'expression de miR-135a au niveau transcriptionnel	94
3. Mécanismes de régulation de la transcription du gène miR-135a2	96
 II. Rôle fonctionnel de miR-135a	 99
1. Expression de miR-135a.....	99
2. Identification des gènes cibles de miR-135a dans les cellules LNCaP.....	101
3. Rôle de miR-135a dans les processus de prolifération, apoptose migration et invasion de cellules prostatiques tumorales	106
a- Rôle de miR-135a dans le cycle cellulaire, la survie, la mort, la migration et l'invasion des cellules PC-3.....	106
b- miR-135a cible les ARNm de ROCK1 et ROCK2.....	110

c- miR-135a inhibe la migration et l'invasion cellulaire en régulant l'expression des ROCKs.....	114
4. Rôle de miR-135a dans la signalisation androgénique	118
a- miR-135a cible directement les ARNm de ESRRA et FOXN3 dans les cellules LNCaP 118	
b- FOXN3 augmente l'activité transcriptionnelle de AR	122
c- Rôle fonctionnel de FOXN3 dans les cellules LNCaP	124
d- FOXN3 diminue la migration cellulaire des cellules PC-3	126
III. Expression de miR-135a et ROCK1 dans des échantillons de cancer de la prostate.....	128
1. L'expression de miR-135a diminue dans les tissus tumoraux et au cours de la progression du cancer de la prostate	128
2. L'expression protéique de ROCK1 est plus forte dans les glandes prostatiques tumorales 134	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	137
I. miR-135a, un miARN surexprimé par les androgènes, diminue la migration et l'invasion de cellules prostatiques tumorales, en ciblant ROCK1 et ROCK2	137
II. miR-135a semble être impliqué dans la voie de signalisation androgénique	145
CONCLUSION GENERALE	154
MATERIEL ET METHODES	156
BIBLIOGRAPHIE	169
ANNEXE : ARTICLE.....	209

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Structure protéique du récepteur aux androgènes.....	20
Figure 2 : Mode d'action génomique des androgènes <i>via</i> le récepteur aux androgènes.....	23
Figure 3 : Séquences consensus des AREs classiques et sélectifs.	25
Figure 4 : Anatomie de l'appareil génital mâle et de la prostate.....	29
Figure 5 : Organisation et rôle des différents types cellulaires prostatiques.....	31
Figure 6 : Nouveaux cas de cancer et cas de mort par cancer, estimés en fonction du sexe. ..	33
Figure 7 : Classification TNM des tumeurs de la prostate.....	37
Figure 8 : Grades de Gleason.	38
Figure 9 : Mécanismes moléculaires du développement du cancer de la prostate résistant à la castration.	45
Figure 10 : Biogenèse des miARNs.	48
Figure 11 : Organisation génomique des miARNs.	50
Figure 12 : Différents types de sites cibles (MRE) des miARNs.....	57
Figure 13 : Site cible de miARN bombé.....	58
Figure 14 : Outils informatiques pour la recherche de cibles de miARNs.	59
Figure 15 : Mécanismes de régulation de l'expression des gènes cibles par les miARNs.	61
Figure 16 : miARNs dérégulés entre le tissu prostatique tumoral et soit le tissu prostatique normal de patients atteints de CaP, soit de l'HBP.....	68
Figure 17 : Fonctions et cibles des miARNs suppresseurs de tumeur dans le cancer de la prostate.	74
Figure 18 : Fonctions et cibles des miARNs oncomiRs dans le cancer de la prostate.....	80
Figure 19 : Régulation androgénique de l'expression de miR-135a.....	92
Figure 20 : Régulation transcriptionnelle de l'expression de miR-135a par les androgènes...	95
Figure 21 : Caractérisation des éléments de régulation transcriptionnelle dans le locus de miR-135a2.	97
Figure 22 : Localisation de l'expression de miR-135a dans le tissu prostatique.	100
Figure 23 : Motif le plus représenté dans la 3'UTR des gènes sous-exprimés dans les cellules surexprimant miR-135a.....	104
Figure 24 : Analyse des voies biologiques statistiquement sur-représentées dans lesquelles sont impliqués les gènes sous-exprimés dans les cellules surexprimant miR-135a.....	105
Figure 25 : Rôle de miR-135a dans différents processus biologiques.	108

Figure 26 : miR-135a régule l'expression de ROCK1 et ROCK2 en interagissant avec leur 3'UTR.....	112
Figure 27 : miR-135a diminue les capacités de migration des cellules PC-3, <i>via</i> la voie de signalisation des ROCKs.....	116
Figure 28 : miR-135a diminue les capacités d'invasion des cellules PC-3, <i>via</i> la voie de signalisation des ROCKs.....	117
Figure 29 : miR-135a régule l'expression de ESRRA et FOXN3 en interagissant avec leur 3'UTR.....	120
Figure 30 : FOXN3 augmente l'activité transcriptionnelle de AR.	123
Figure 31 : Rôle fonctionnel de FOXN3 dans les cellules LNCaP.	125
Figure 32 : FOXN3 diminue la migration des cellules PC-3.	127
Figure 33 : L'expression de miR-135a est inversement corrélée à la progression tumorale.	130
Figure 34 : L'expression de miR-135a n'est pas corrélée aux autres caractéristiques clinico-pathologiques.	132
Figure 35 : Expression protéique de ROCK1 dans des tissus prostatiques tumoraux.	135
Figure 36 : Modèle pour expliquer le rôle potentiel de miR-135a, un microARN androgénorégulé, dans le cancer de la prostate, <i>via</i> la régulation de ROCK1/2.	144
Figure 37 : Expression de miR-135a dans différentes lignées cellulaires.....	148
Figure 38 : miR-135a induit un retard d'adhésion des cellules PC-3	150
Figure 39 : Régulation androgénique de l'expression de miR-135b.....	152
Figure 40 : Modèle du rôle potentiel de miR-135a au cours de la progression du cancer de la prostate.	155
Tableau 1 : miARNs dérégulés dans le CaP par rapport au tissu sain ou à l'HBP.	67
Tableau 2 : miARNs dérégulés dans les lignées AI par rapport aux lignées AD.....	71
Tableau 3 : Gènes cibles potentiels de miR-135a.	103
Tableau 4 : Caractéristiques pathologiques des échantillons de patients atteints de cancer de la prostate.	166
Tableau 5 : Caractéristiques clinico-pathologiques des échantillons de patients atteints de cancer de la prostate.	167

ABREVIATIONS

ACTH	Adreno-cortico-trophic hormone
AD	Andrognéo-dépendante
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADT	Androgen deprivation therapy
AES	Aminoterminal enhancer of split
AF	Activating function
Ago	Argonaute
Ago2	Argonaute RISC catalytic component 2
AI	Androgéno-indépendante
AJCC	American joint committee on cancer
Akt	v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AMACR	Alpha-methylacyl-coA racemase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Jun proto-oncogene
AP-2alpha	Activating enhancer binding protein 2 alpha
APC	adenomatous polyposis coli
AR	Androgen receptor
ARE	Androgen response element
ARHI	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	American type culture collection
ATP	Adénosine triphosphate
AUA	American urological association
Bak1	BCL2-antagonist/killer 1
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-w	BCL2-like 2
Bim	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BMP	Bone morphogenetic protein
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
BrdU	Bromodéoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
BTG2	BTG family, member 2
c-myb	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)
c-myc	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
CaP	Cancer de la prostate
CDK	Cyclin-dependent kinase
CHES1	Checkpoint suppressor 1
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CKAP2	Cytoskeleton associated protein 2
CTD	C-terminal domain
clARE	Classical ARE
CRPC	Castration resistant prostate cancer
CSC	Cancer stem cell
DBD	DNA binding domain
DDX5/17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 5/17

ABREVIATIONS

DGCR8	Digeorge syndrome critical region gene 8
DHEA	Déhydroépiandrosterone
DHT	Dihydrotestostérone
DIG	Digoxygénine
DIOC6	3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
Dkk-3	Dickkopf 3 homolog (<i>Xenopus laevis</i>)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
E2F1/2/3/5/6	E2F transcription factor 1/ 2/3/5/6
EGF	Epidermal growth factor
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EMT	Epithelial–mesenchymal transition
ER α	Estrogen receptor alpha
ErbB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
ERG	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)
ERK1/2/5	Mitogen-activated protein kinase 3/2/7
ERRs	ER-related receptors
ESMO	European society for medical oncology
ESRRA	Estrogen-related receptor alpha
EST	Expressed sequence tags
ETV1	Ets variant 1
EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1
EXP-5	Exportin-5
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2 (<i>Drosophila</i>)
Fas	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
FAIM	Fas apoptotic inhibitory molecule
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
FGFR-1	Fibroblast growth factor receptor 1
FNDC3B	Fibronectin type III domain containing 3B
FOX	Forkhead box
FSCN1	Fascin homolog 1, actin-bundling protein
FSH	Follicle stimulating hormone
FUS	Fused in sarcoma
GAP	GTPases activating proteins
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
HAT	Histones acétyle transférases
HBP	Hyperplasie bénigne prostatique
HDAC	Histones désacétylase
HDM	Histones déméthylases
hESC	Human embryonic stem cell
HIF	Hypoxia inducible factor
HIFU	High-intensity focused ultrasound
HIS	Hybridation in situ
HMT	Histone méthyltransferases
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HOXA10	Homeobox A10
HSP	Heat-shock protein

ABREVIATIONS

HuR	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, <i>Drosophila</i>)-like 1 (HuantigenR)
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like growth factor
IHC	Immunohistochimie
IL-6	Interleukin 6
JAK2	Janus kinase 2
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)
KLK	Kallikrein
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LBD	Ligand binding domain
LH	Luteinizing hormone
LHRH	Luteinizing hormone-releasing hormone
LNA	Locked nucleic acid
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MET	Mesenchymal–epithelial transition
miARN, miR	MicroARN
miRISC	MiRNA-induced silencing complex
Miz1	Protein inhibitor of activated STAT, 2
MNAR	Modulator of nongenomic actions of the estrogen receptor
MRE	MiRNA response element
MTSS1	Metastasis suppressor 1
MTF-1	Metal-regulatory transcription factor 1
NF-Y	Nuclear transcription factor Y
NF-κB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NKX3-1	NK3 homeobox 1
NTD	N-terminal domain
OCT4	POU class 5 homeobox 1
ORF	Open Reading Frame
P14	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
P21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
P27	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9
P53	Tumor protein p53
P65	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
PAR-3/6	Par-3/6 partitioning defective 3/6 homolog (<i>C. elegans</i>)
PAZ	Piwi/Argonaute/Zwille
PB	Probasin
PCA3	Prostate cancer antigen 3
PCAF	p300/CBP-associated factor
PCSC	Prostate cancer stem cell
PDCD4	Programmed cell death 4
PDGF-D	Platelet derived growth factor D
PFA	Paraformaldehyde
PI	Iodure de propidium
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase
PIK3IP1	Phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1
PKA/C	Protéine kinase A/C
PNP	Purine nucleoside phosphorylase
PrEC	Prostate epithelial cells
PSA	Prostate specific antigen

ABREVIATIONS

PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Puma	BCL2 binding component 3
R1881	Méthyltriénolone
RAN	RAS-related nuclear protein
RAN-GAP	RAN-GTPase activating protein
RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
Rho	Ras homolog family member
RISC	RNA induced silencing complex
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMST	Rhabdomyosarcoma 2 associated transcript
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuclease
ROCK1/2	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1/2
RT-PCRq	Reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SC	Secretary component
selARE	Selective ARE
SHBG	Sex Hormone Binding Globulin
siARN	Petit ARN interférent
SIRT1	Sirtuin 1
SKIP	SNW domain containing 1
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase
Slp	Sex-limited protein
SMAD4/5	SMAD family member 4/5
SNAI2	Snail homolog 2 (Drosophila)
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
Sp	Specificity protein
Src	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator-1
SVF	Sérum de veau fœtal
SWAP70	SWAP switching B-cell complex 70kDa subunit
TF	Transcription factor
TGF α / β	Transforming growth factor alpha/beta
TIF2	Transcription intermediary factor 2
TNF- α	Tumor necrosis factor
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
TNM	Tumor node and metastases
TMPRSS2	TransMembrane Protease Serine 2
TRAIL	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
TRBP	TAR (HIV-1) RNA binding protein 2
TRITC	Tetramethyl rhodamine iso-thiocyanate
TSS	Transcription start site
USP2a	Ubiquitin specific peptidase 2
UTR	Untranslated region
VEGF	Vascular endothelial growth factor A
Wnt3a	Wingless-type MMTV integration site family, member 3A
YATAK	Yet another tool for analysis of kymographs
ZBTB4	Zinc finger and BTB domain containing 4
ZEB1/2	Zinc finger E-box binding homeobox 1/2

INTRODUCTION

I. Les androgènes

Les androgènes sont les hormones sexuelles mâles qui appartiennent à la famille des hormones stéroïdiennes. Elles sont principalement produites par les testicules et les glandes surrénales. En début de vie, les androgènes testiculaires induisent les processus de différenciation qui conduisent au développement du phénotype mâle. Durant l'âge adulte, les androgènes restent essentiels pour le maintien de la fonction reproductrice mâle, ainsi que d'un certain nombre de paramètres dépendants du genre, tels que la masse musculaire et osseuse, la croissance des cheveux et le comportement (Mooradian *et al.*, 1987; Wilson, 1999). Ils jouent un rôle important dans la physiologie normale ; c'est pourquoi des dérégulations dans la production ou l'action des androgènes peuvent affecter différents organes. Cela se reflète dans des pathologies allant de l'acné et l'alopécie masculine, au syndrome d'insensibilité aux androgènes et au cancer de la prostate (McCarthy, 2011).

1. Biosynthèse, transport et métabolisme des androgènes

La synthèse biochimique des hormones stéroïdiennes dérive du cholestérol et seuls quelques tissus peuvent, sous stimulation par des hormones hypophysaires, convertir le cholestérol en prégnénolone, le premier précurseur de la stéroïdogénèse (Auchus and Auchus, 2012; Miller, 1998).

La testostérone, androgène majeur chez l'homme, est principalement produite (95%) par le testicule, sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Denis and Griffiths, 2000). L'hypothalamus sécrète la LHRH qui agit au niveau de l'hypophyse et induit la sécrétion de la LH et la FSH. Ces hormones passent dans la circulation générale et ont pour cible, au niveau testiculaire, les cellules de Leydig pour la LH et les cellules de Sertoli pour la FSH (Shalev and Leung, 2003). La LH va alors induire l'entrée du cholestérol dans la voie de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig, cellules endocrines qui produisent les androgènes, notamment la testostérone.

Une petite portion de la testostérone plasmatique (5%) est produite par les glandes surrénales, sous la dépendance de l'ACTH hypophysaire (Denis and Griffiths, 2000). La glande surrénale produit aussi de l'androstènedione et la déhydroépiandrostérone, qui sont converties en testostérone dans les tissus périphériques.

Les stéroïdes synthétisés régulent leur propre production par une boucle de rétrocontrôle négatif sur chacune de ces voies.

La testostérone diffuse alors librement à travers la membrane des cellules de Leydig jusqu'au sang veineux périphérique, où sa concentration atteint 3-10 ng/ml.

Dans le plasma, la testostérone circule sous 3 formes : 2% sous forme libre, seule forme utilisable directement par les tissus, 45-75% sont liés aux protéines de transport des stéroïdes sexuels, SHBG et 30 à 55% sous forme liée à l'albumine (Rosner, 1991). Les protéines de liaison servent de réserve de stéroïdes qui, autrement, seraient rapidement métabolisés par le foie.

La testostérone libre traverse la membrane de cellules cibles et peut agir directement ou par l'intermédiaire de sa bioconversion en dihydrotestostérone (DHT). La DHT est convertie à partir de la testostérone par l'action d'une enzyme, la 3-oxo-5 α -steroid 4-dehydrogenase, connue sous le nom de 5 α -réductase. La testostérone et la DHT peuvent lier et activer le récepteur aux androgènes (AR) dans des conditions physiologiques. Cependant la DHT a une affinité plus grande pour AR et représente la forme la plus active biologiquement (Wright *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1995).

2. Le récepteur aux androgènes (AR)

La majeure partie des actions biologiques des androgènes est réalisée *via* le récepteur aux androgènes, AR. Membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, il agit comme facteur de transcription dépendant d'un ligand (Lubahn *et al.*, 1988).

AR est exprimé dans de nombreux tissus (McKenna *et al.*, 2009). Il présente toutefois un degré d'expression très variable selon les tissus, et pour un tissu donné selon son stade de développement et son degré de différenciation cellulaire. AR est fortement exprimé dans les organes sexuels (prostate, testicules) mais aussi dans le cœur, le muscle et le foie et est plus faiblement exprimé dans les autres tissus androgéno-sensibles, comme l'os.

Le gène codant pour AR, d'environ 90 kb, est localisé sur le chromosome X (q12) et code pour une protéine de 110 kDa. De nombreux variants d'épissage alternatif ont été identifiés dans des conditions pathologiques incluant le cancer de la prostate et le syndrome d'insensibilité aux androgènes. Des isoformes d'épissage alternatif de AR ont également été observées dans des tissus non cancéreux ; cependant leur rôle dans les processus cellulaires normaux reste inconnu (Dehm and Tindall, 2011; Haile and Sadar, 2011).

a- Structure et domaines fonctionnels de AR

La protéine AR est constituée de quatre régions fonctionnelles majeures (**Figure 1**) communes à tous les récepteurs nucléaires : un domaine N-Terminal (NTD) peu conservé entre les récepteurs nucléaires, un domaine de liaison à l'ADN (DBD) fortement conservé, un domaine de liaison au ligand (LBD) en C-Terminal et une courte séquence d'acides aminés appelée région charnière (Hinge) qui sépare le DBD du LBD (Claessens *et al.*, 2008; Gelmann, 2002; Heinlein and Chang, 2004).

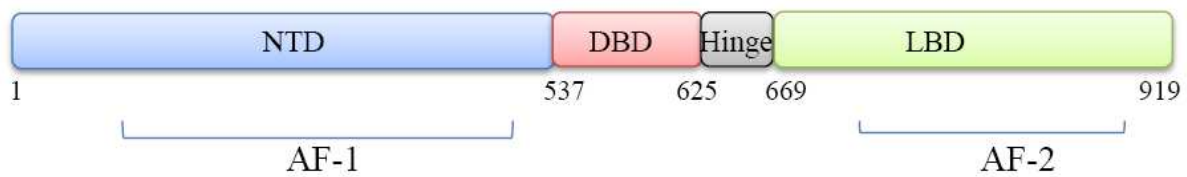


Figure 1 : Structure protéique du récepteur aux androgènes.

Les quatre régions constituant le récepteur des androgènes sont représentées : la région N-terminale (NTD), contenant la fonction de transactivation de la transcription AF-1 indépendante du ligand ; le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et au ligand (LBD) séparés par la région charnière (Hinge). Le LBD contient un site d'activation de la transcription dépendant de la liaison du ligand, AF-2. Figure modifiée à partir de Lonergan *et al* (Lonergan and Tindall, 2011).

Le domaine N-Terminal (NTD) est le support de l'activité AF-1 (Fonction d'Activation 1) (**Figure 1**) qui est impliquée dans la transactivation de la transcription, indépendamment du ligand (Jenster *et al.*, 1995). Le NTD sert de plateforme flexible de recrutement et d'assemblage de corégulateurs et de protéines de la machinerie transcriptionnelle (Bevan *et al.*, 1999; He *et al.*, 2002; McEwan and Gustafsson, 1997; Simental *et al.*, 1991). De plus, il s'agit de la région majeure de phosphorylation de AR, nécessaire pour sa localisation nucléaire et pour la réalisation de ses activités transcriptionnelles (Wang *et al.*, 1999).

Le DBD est formé de deux motifs en doigt de zinc (Schoenmakers *et al.*, 1999). Le premier définit la spécificité de liaison et coordonne les contacts avec des nucléotides spécifiques de l'ADN (Hard *et al.*, 1990). Le second fonctionne comme site de liaison DBD/DBD facilitant l'homodimérisation du récepteur et permettant la stabilisation du complexe ADN-récepteur (Dahlman-Wright *et al.*, 1993; Gewirth and Sigler, 1995; Schoenmakers *et al.*, 1999).

La région charnière (Hinge) sert de pont entre le DBD et le LBD et donne une flexibilité à AR. C'est un site important de phosphorylation, acétylation et ubiquitination et contient une des parties du signal de localisation nucléaire ligand-dépendant, pour l'import nucléaire de AR (Fu *et al.*, 2003; Gioeli *et al.*, 2002; Saporita *et al.*, 2003; Tanner *et al.*, 2004). De plus, cette région joue un rôle central dans le contrôle de l'activité de AR, en régulant le potentiel de transactivation et la mobilité intranucléaire du récepteur (Clinckemalie *et al.*, 2012).

Le LBD constitue le site de liaison des ligands (la testostérone et la DHT). La structure du LBD, formée par 11 hélices alpha conservées, forme une poche de liaison au ligand. Sous liaison des androgènes, l'hélice 12 est repositionnée pour couvrir la poche de liaison, formant la surface d'activation de la fonction AF-2, avec laquelle les coactivateurs peuvent interagir (Heery *et al.*, 1997; Moras and Gronemeyer, 1998). Cependant, contrairement à l'AF-2 des autres récepteurs nucléaires, l'AF-2 de AR interagit préférentiellement avec un motif du NTD pour former l'interaction NTD/CTD (van de Wijngaart *et al.*, 2011), favorisant l'activation de la transcription de AR après liaison du ligand (van Royen *et al.*, 2007).

Des signaux de localisation nucléaire existent dans le NTD, le LBD et la région charnière (Kaku *et al.*, 2008), suggérant que l'import nucléaire de AR est régulé par l'interaction entre chaque domaine du récepteur. Une protéine du cytosquelette, la Filamine-

A, interagit avec certains de ces domaines, facilitant la translocation de AR dans le noyau (Ozanne *et al.*, 2000).

b- Action génomique des androgènes *via* AR

- **Mécanisme d'action de AR**

En absence de ligand, AR est localisé dans le cytoplasme, où il s'associe avec les protéines chaperon HSP (heat-shock protein), les protéines du cytosquelette et d'autres protéines chaperon (Pratt and Toft, 1997; Smith and Toft, 2008). Les HSP maintiennent AR dans un état inactif mais capable de lier une hormone.

La liaison de la DHT conduit à la libération des protéines chaperon, suivie d'une phosphorylation et d'un changement de configuration allostérique du récepteur. Cette modification conformationnelle, notamment dans la poche hydrophobe du LBD, facilite l'interaction intramoléculaire NTD/CTD et intermoléculaire, à l'origine de l'homodimérisation de AR.

Le complexe est ensuite transloqué dans le noyau, où AR se lie à des séquences spécifiques de l'ADN, les éléments de réponse aux androgènes (AREs), situés dans les régions activatrices et promotrices des gènes cibles (Claessens *et al.*, 2008; Claessens *et al.*, 2001; Mangelsdorf *et al.*, 1995).

L'homodimère rassemble des molécules additionnelles dont des cofacteurs de type coactivateurs (tels que SRC-1 (Bevan *et al.*, 1999) et TIF2 (Berrevoets *et al.*, 1998)) ou corépresseurs (tels que NCoR et SMRT (Wang *et al.*, 2005)), des facteurs de transcription et l'ARN polymérase II. Ce recrutement a pour conséquence, soit d'activer la transcription des gènes cibles, soit de l'inhiber (**Figure 2**).

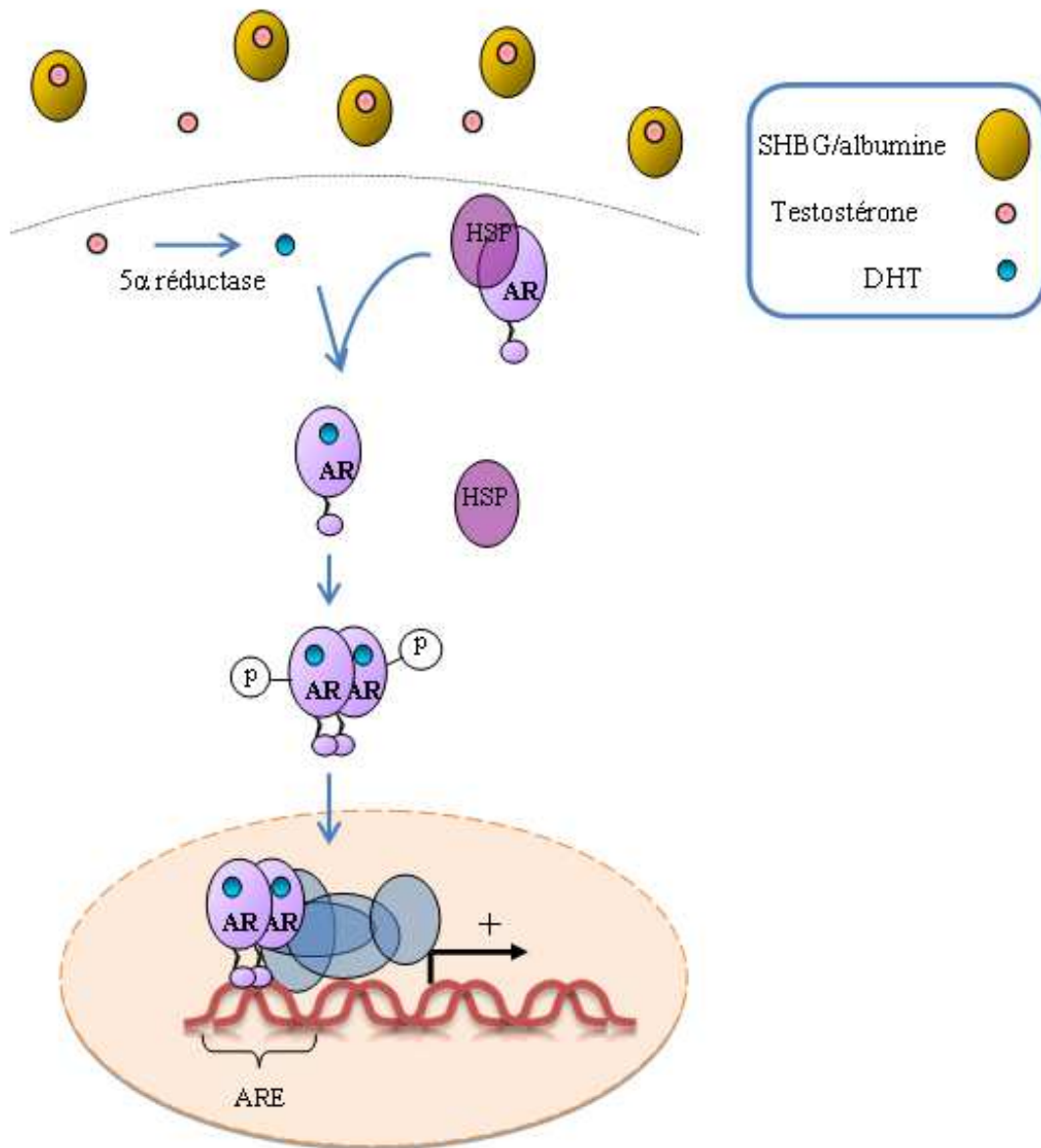


Figure 2 : Mode d'action génomique des androgènes *via* le récepteur aux androgènes.

La testostérone circule dans le sang principalement liée à la SHBG ou à l'albumine. La testostérone libre entre dans la cellule prostatique et est convertie en dihydrotestostérone (DHT) par l'enzyme 5α-réductase. La DHT se lie à AR, induit la dissociation de AR et des HSP, la dimérisation et la phosphorylation de AR. Le complexe entre dans le noyau, se lie aux éléments de réponse aux androgènes (AREs) au niveau du promoteur de gènes cibles de AR. Des coactivateurs ou corépresseurs (non illustrés) se lient aussi à ce complexe DHT/AR, facilitant ou inhibant, respectivement, son interaction avec la machinerie transcriptionnelle. L'activation de gènes cibles conduit à des réponses biologiques comme la croissance et la survie des cellules prostatiques.

• Éléments de réponse aux androgènes

Les récepteurs stéroïdiens se lient à des séquences d'ADN, appelées éléments de réponse aux hormones. Ces éléments sont des sites hexamériques organisés en répétition inversées (palindromes) et séparés par 3 nucléotides. Les récepteurs forment des homodimères où chacun des monomères se fixe sur un demi-site de l'ARE.

Pour les récepteurs aux androgènes, aux glucocorticoïdes, à la progestérone et aux minéralocorticoïdes, le site consensus est 5'-TGTTCT-3' (5'-AGAACA NNN TGTTCT-3') (Cato *et al.*, 1987; Ham *et al.*, 1988). De telles séquences de liaison ont été décrites dans les gènes androgéno-régulés et sont appelées éléments de réponse aux androgènes classiques (clAREs). La séquence consensus de huit clAREs (Moehren *et al.*, 2008) est décrite **Figure 3**.

Bien que les séquences des éléments de réponse des récepteurs stéroïdiens soient similaires, les récepteurs reconnaissent avec une spécificité différente ces séquences. Pour chaque type de récepteur, la spécificité de liaison à l'ADN semble être déterminée par l'espacement de ces hexamères, ainsi que la séquence du site à l'intérieur et autour de ces séquences répétées et enfin, par la différence d'extension C-terminale des récepteurs, située à la fin du DBD (Schoenmakers *et al.*, 1999).

Il existe donc une forte homologie des DBD et une similarité des éléments de réponse pour ces quatre récepteurs nucléaires. Cependant, AR tient une position spécifique dans ce groupe de récepteurs stéroïdiens, puisque plusieurs AREs sélectifs ont été identifiés (selAREs). Les selAREs ont d'abord été découverts à proximité du gène de la probasine (PB), du gène Slp (sex-limited protein) et du gène SC (secretary component) (Adler *et al.*, 1991; Rennie *et al.*, 1993; Verrijdt *et al.*, 1999). La comparaison des séquences des selAREs décrits dans ces trois gènes semble indiquer qu'ils sont organisés en répétitions directes plutôt que inversées du même motif 5'-TGTTCT-3' (5'-TGTTCT NNN TGTTCT-3') (Adler *et al.*, 1993; Kasper *et al.*, 1994; Verrijdt *et al.*, 2000). La séquence consensus de quatre selAREs (Moehren *et al.*, 2008) est décrite **Figure 3**.

Les séquences activatrices spécifiques des androgènes contiennent des clAREs et des selAREs proches (Claessens *et al.*, 2008). Cependant, des techniques permettant d'identifier les sites de liaison des facteurs de transcription sur de larges régions du génome ont montré que plus de 50% des sites enrichis en AR ne contiennent ni l'organisation en répétitions

directes ni en répétitions inversées des ARE, indiquant une plus grande complexité de la régulation par AR (Massie *et al.*, 2007).

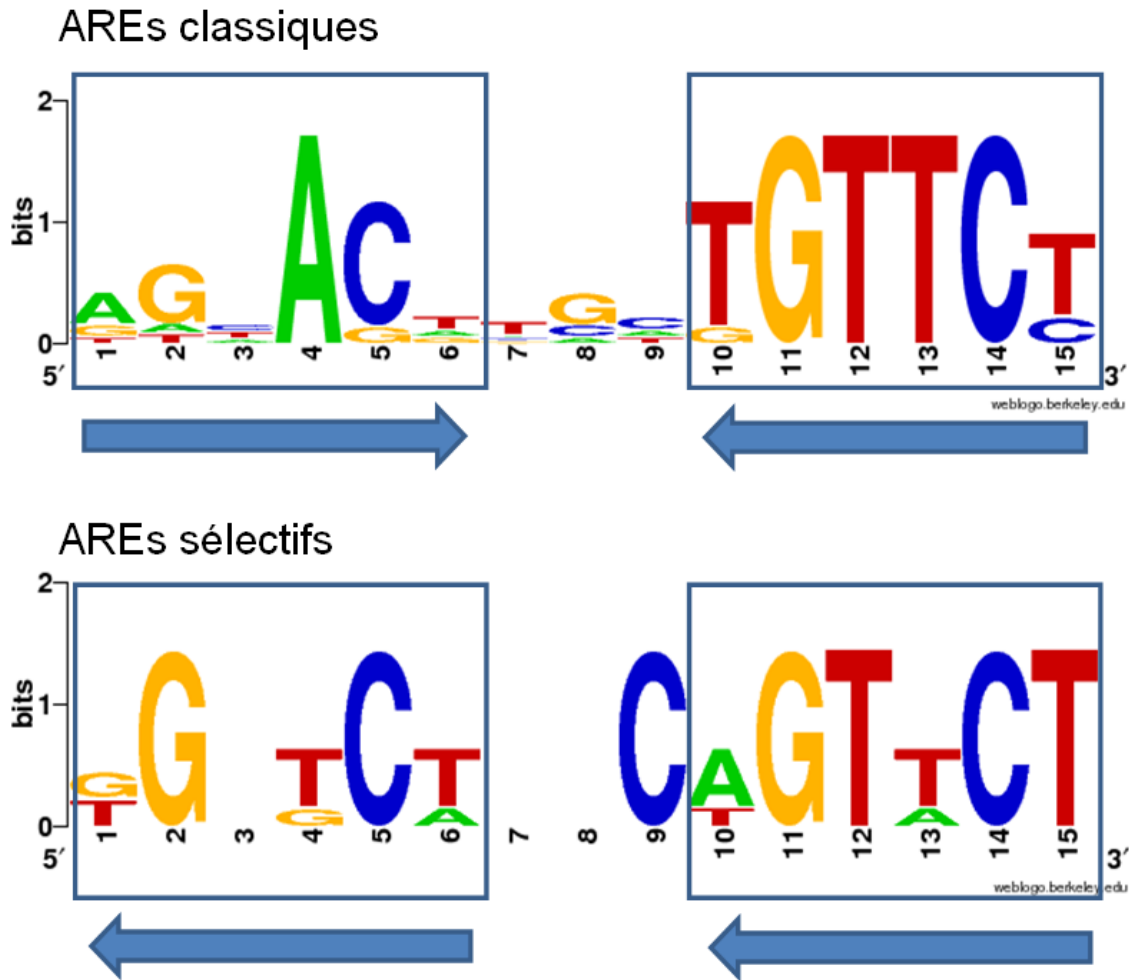


Figure 3 : Séquences consensus des AREs classiques et sélectifs.

Les AREs classiques sont reconnus par d'autres récepteurs nucléaires que AR, alors que les AREs sélectifs sont spécifiques de AR. Figure créée à l'aide de WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu>) et à partir des séquences décrites dans la revue Moehren *et al* (Moehren *et al.*, 2008) .

• Interaction avec les cofacteurs et facteurs de transcription

En dehors des composants de la machinerie transcriptionnelle, les protéines interagissant avec AR sont divisées en deux groupes : les cofacteurs et les facteurs de transcription spécifiques.

Actuellement, plus de 200 protéines ont été identifiées comme cofacteurs de AR, depuis la découverte du premier coactivateur SRC-1 (Onate *et al.*, 1995).

Un groupe majeur de corégulateurs de AR est composé d'enzymes modificatrices des histones. Le recrutement par AR d'histones acétyl transférase (HAT), telles que p300/CBP et p160/SRC (Aarnisalo *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1999), active sa transcription, tandis que le recrutement d'histones désacétylases (HDAC), telles que SIRT1 (Fu *et al.*, 2006) l'inhibe. Les HAT et HDAC agissent sur les histones mais peuvent également acétyler ou désacétyler AR, influençant ses capacités transcriptionnelles, dépendantes du ligand (Fu *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2012). De plus, ils peuvent recruter d'autres complexes régulateurs de AR (Huang *et al.*, 2003). La méthylation des histones peut entraîner soit une activation, soit une répression de l'activité de AR, selon la position des résidus méthylés et l'étendue de la méthylation du résidu (Zhou *et al.*, 2011). Des histones méthyltransférases (HMT), tels que SET9 et des histones déméthylases (HDM), tels que JMJD2C et LSD1 (Wissmann *et al.*, 2007) sont donc des cofacteurs de AR. SET9, connu pour son activité méthyltransférase d'histones, peut également méthyler AR (Gaughan *et al.*, 2011; Ko *et al.*, 2011), facilitant l'interaction entre les domaines AF-1 et AF-2 de AR.

Bien que moins connue, l'ubiquitination joue un rôle important dans l'action biologique de AR. Par exemple, les monoubiquitine ligases RNF20 et RNF40 interagissent directement avec AR et coactivent l'expression de gènes androgéno-régulés (Jaaskelainen *et al.*, 2012). Plusieurs polyubiquitine ligases, dont E6-AP, MDM2, PIRH2, SNURF/RNF4 et CHIP, ont été identifiées comme corépresseurs de AR (Heemers and Tindall, 2007). La polyubiquitination de AR sert de signal pour la dégradation de la protéine par le protéasome et ces corégulateurs régulent donc le renouvellement du récepteur.

Les composants du complexe de remodelage de la chromatine permettent également de réguler l'activité transcriptionnelle de AR. L'activation de gènes cibles de AR requiert, par exemple, l'assemblage des complexes SWI/SNF et la présence des ATPases BRG1 et BRM pour l'activité de remodelage de la chromatine (Link *et al.*, 2008).

D'autres classes de corégulateurs de AR incluent des protéines impliquées dans l'épissage et la dégradation de l'ARN, des composants de la voie de sumoylation, des protéines chaperon, des régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose, des protéines kinases et phosphatases, des suppresseurs de tumeurs et des oncogènes et d'autres protéines spécifiques (Heemers and Tindall, 2007).

Des études ont mis en évidence la fixation de AR à proximité de sites de liaison pour des facteurs de transcription, tels que GATA2, OCT1, FOXO1, NF1, C/EBP α et FOXA1, impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de AR (Jia *et al.*, 2008; Massie *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). De nombreux facteurs de transcription, dont ceux cités ci-dessus, interagissent physiquement avec AR et régulent différemment son activité. FOXA1 se lie aux motifs FOX sur l'ADN, dans des régions de chromatine fortement compactée et induit le relâchement (Cirillo *et al.*, 2002; Pierrou *et al.*, 1994; Sekiya *et al.*, 2009; Serandour *et al.*, 2011). Avec son potentiel d'ouverture de la chromatine, il est appelé facteur « pionnier », et peut ainsi permettre à d'autres facteurs de transcription, dont AR, de déclencher des programmes transcriptionnels (Gao *et al.*, 2003; Magnani *et al.*, 2011; Zaret *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011a).

3. Actions non-génomiques des androgènes

En plus du mode d'action génomique des stéroïdes, de nombreuses études suggèrent que les androgènes, comme la progestérone et les œstrogènes, peuvent exercer un effet rapide, non-génomique (Falkenstein and Wehling, 2000; Revelli *et al.*, 1998; Wehling, 1997).

L'activité stéroïdienne non-génomique active des cascades de transduction du signal, comme les voies MAPK, PI3K/AKT, PLC γ /PKC/PKA, aboutissant à l'activation de protéines cytoplasmiques, de canaux ioniques et/ou de facteurs de transcription (Michels and Hoppe, 2008). Ces effets apparaissent dans les secondes ou minutes et sont considérés comme étant trop rapides pour impliquer des changements dans la transcription ou la synthèse protéique (Fix *et al.*, 2004; Heinlein and Chang, 2002).

La testostérone peut exercer son action en se liant à des protéines, comme par exemple la SHGB. Le complexe testostérone-SHGB peut se fixer au récepteur membranaire des SHGB et transmettre un signal, *via* une protéine G, entraînant une activation de l'adénylate cyclase et une génération rapide d'AMPc dans les minutes (Rosner *et al.*, 1999b).

Dans certains cas, l'activation rapide des voies MAPK et PI3K/AKT par les androgènes requiert la présence de AR et peut être inhibée à l'aide d'antagonistes du récepteur. En effet, AR activé par l'hormone peut être recruté au niveau de la membrane plasmique où il interagit alors avec la tyrosine kinase cytoplasmique Src pour activer ces deux voies de signalisation (Castoria *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007; Unni *et al.*, 2004).

De plus, les voies PLC γ , PKA et MAPK peuvent être activées par la testostérone couplée à la BSA, incapable de diffuser rapidement dans le cytoplasme, ainsi que par l'activation de protéines G (Benten *et al.*, 1999; Estrada *et al.*, 2003; Rosner *et al.*, 1999a; Somjen *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent la présence d'un récepteur membranaire aux androgènes couplé aux protéines G. Des sites de liaison putatifs sont décrits pour toutes les classes majeures de stéroïdes (Falkenstein *et al.*, 2000), incluant les androgènes (Heinlein and Chang, 2002). Ce récepteur membranaire a été mis en évidence dans les cellules prostatiques tumorales induisant une activation rapide de ERK1/2 (Wang *et al.*, 2008c).

II. Le cancer de la prostate

1. La prostate

a- Anatomie et fonction

La prostate est un organe, d'environ 3 cm de haut et 2,5 cm de profondeur, faisant partie des glandes annexes de l'appareil génital mâle. Elle est située dans le pelvis, sous la vessie, et est traversée par l'urètre prostatique dont elle constitue la paroi (**Figure 4A**). La prostate englobe le carrefour des voies urinaires et des voies génitales : elle contient les canaux éjaculateurs (jonction du canal déférent et de l'abouchement de la vésicule séminale) qui vont se jeter dans l'urètre (**Figure 4B**). L'urètre a deux fonctions : évacuer l'urine pendant la miction et transporter le sperme pendant l'éjaculation.

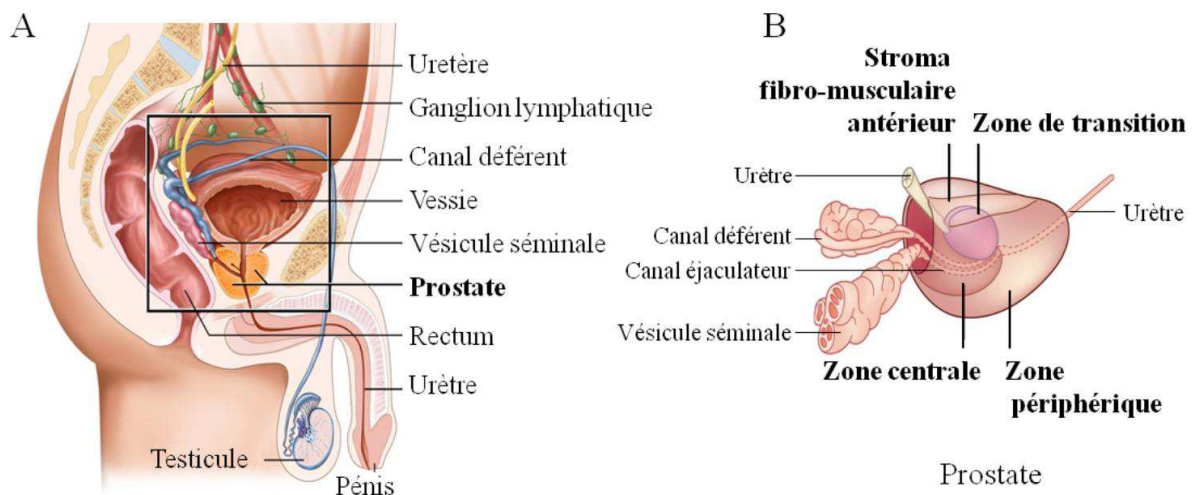


Figure 4 : Anatomie de l'appareil génital mâle et de la prostate.

A. Localisation spatiale de la prostate chez l'homme au milieu des organes avoisinants. Figure modifiée à partir de *cancer.gov* (National Cancer Institute).

B. Anatomie de la prostate. La prostate est divisée en 4 zones : le stroma fibro-musculaire antérieur, la zone de transition, la zone centrale et la zone périphérique. Elle englobe le carrefour de l'urètre et des canaux éjaculateurs. Figure modifiée à partir de *bjr.birjournals.org*.

La fonction principale de la glande prostatique est la sécrétion de substances entrant dans la composition du liquide séminal, l'un des constituants du sperme, qui permet de nourrir et de protéger les spermatozoïdes. Ce liquide séminal est composé de nombreuses enzymes dont la phosphatase acide (PAP) et l'antigène spécifique de la prostate (PSA), ce dernier

participant à la liquéfaction du sperme. La prostate est également constituée d'une partie musculaire, qui aide à expulser le sperme pendant l'éjaculation.

Elle est composée d'environ 70% d'éléments glandulaires et 30% de stroma fibro-musculaire. Les éléments glandulaires sont formés d'acini (cavités épithéliales arrondies bordées par des cellules sécrétrices) qui débouchent dans de multiples petits canaux et qui s'ouvrent sur la lumière de l'urètre prostatique.

La prostate est divisée en quatre zones (McNeal, 1981) (**Figure 4B**):

- Le stroma fibro-musculaire antérieur, qui contient peu de glandes et est constitué essentiellement de tissu musculaire lisse et de tissu fibreux dense ;
- La zone centrale traversée par les canaux éjaculateurs ;
- La zone périphérique (la plus large), qui contient environ 75% du tissu glandulaire prostatique ;
- La zone de transition, qui représente 5% du tissu glandulaire prostatique.

Les androgènes contrôlent la différenciation sexuelle masculine durant l'embryogenèse, la sécrétion du sperme dès la puberté et l'homéostasie de la prostate durant la vie adulte (Heinlein and Chang, 2004; Huggins, 1941). A l'état adulte, la taille de la glande prostatique est maintenue grâce à une balance homéostatique entre la prolifération et la mort cellulaire régulée par les androgènes (Cunha *et al.*, 2004).

b- Histologie et cytologie

L'épithélium prostatique, qui assure la fonction sécrétoire, est composé de plusieurs types cellulaires différenciés dont les cellules basales, les cellules luminales et les cellules endocrines.

Il est organisé principalement en deux couches cellulaires : la couche basale et la couche luminale (Long *et al.*, 2005) (**Figure 5**). La couche basale renferme des cellules souches (Rizzo *et al.*, 2005), ainsi que des cellules intermédiaires prolifératrices. Ces dernières sont dans un état intermédiaire entre les cellules non différenciées (cellules souches) et les cellules différenciées de la couche supérieure. Leur fonction serait de maintenir le stock de cellules épithéliales de la prostate. La seconde couche est la couche luminale, composée de cellules sécrétrices différenciées et polarisées. Elles expriment AR et peuvent donc répondre

directement aux androgènes, en stimulant la production et la sécrétion de protéines prostatiques, telles que le PSA et la PAP, dans la lumière glandulaire.

Les cellules neuroendocrines, dispersées dans toute la glande prostatique (**Figure 5**), sont insensibles aux androgènes (Abrahamsson, 1996). Leur rôle exact n'est actuellement pas complètement compris, mais ces cellules semblent jouer un rôle dans la croissance et la différenciation de la prostate (di Sant'Agnese, 1998).

Le stroma est essentiellement constitué de cellules musculaires lisses, de fibroblastes et de myofibroblastes. Il joue un rôle déterminant dans la survie des cellules épithéliales, en produisant de nombreux facteurs de croissance (Wong and Wang, 2000). Certaines de ces cellules expriment AR et de nombreux facteurs de croissance sont produits sous l'influence des androgènes. Ces facteurs agissent de façon paracrine sur les cellules épithéliales prostatiques (D'Antonio *et al.*, 2009) (**Figure 5**).

Le stroma est séparé du tissu épithélial par la membrane basale (**Figure 5**). La matrice extracellulaire, les facteurs de croissance provenant du stroma ainsi que les androgènes sont essentiels au bon fonctionnement et à la différenciation de l'épithélium prostatique.

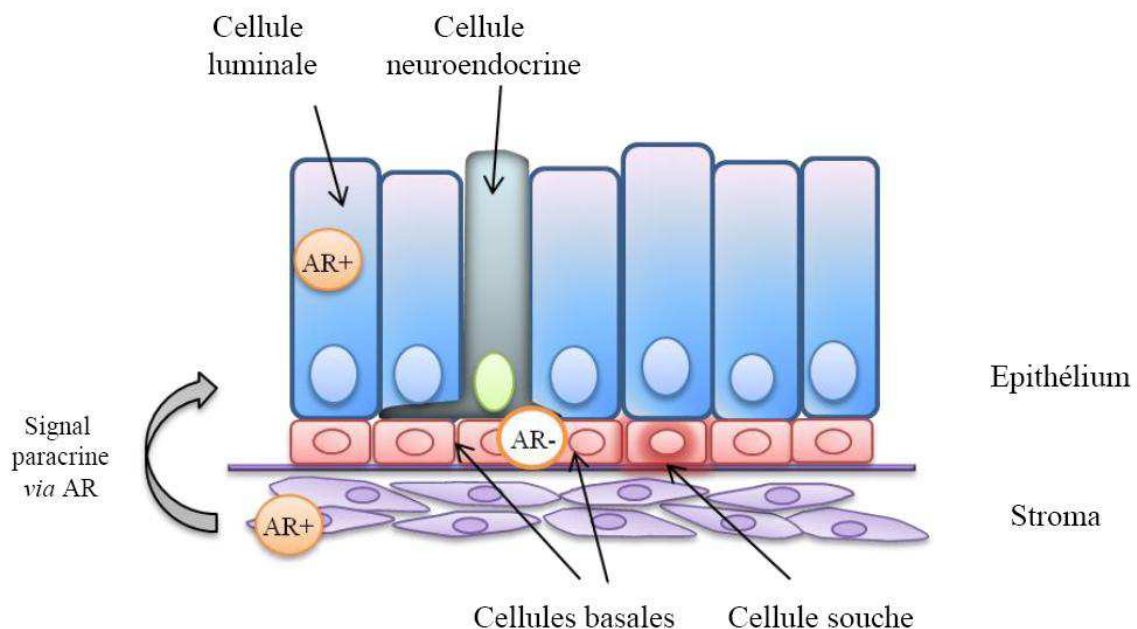


Figure 5 : Organisation et rôle des différents types cellulaires prostatiques.

Les cellules stromales sécrètent, en partie *via* la voie de signalisation androgénique, des facteurs de croissance qui vont agir de façon paracrine sur les cellules épithéliales afin d'induire leur différenciation. Les cellules épithéliales différenciées expriment AR et sécrètent les enzymes du fluide séminal (PSA, PAP).

D'après D'Antonio *et al* et Taylor *et al* (D'Antonio *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2010).

c- Pathologies prostatiques

En dehors des malformations, déformations et inflammations, il existe deux pathologies prostatiques principales : l'hyperplasie bénigne prostatique (HBP) et le cancer de la prostate (CaP).

L'hyperplasie est une prolifération cellulaire prostatique anarchique des différents constituants (épithélial, musculaire lisse et fibroblastique). C'est dans la zone de transition et la zone centrale, qui sont au contact de l'urètre et des canaux éjaculateurs, que se développe l'HBP. Les signes cliniques sont liés à l'augmentation de la taille de la prostate, induisant l'obstruction des voies urinaires. Cette affection n'est pas d'origine cancéreuse (adénome). Elle n'augmente pas le risque de cancer de la prostate, mais n'empêche pas non plus son développement.

Le CaP touche majoritairement (dans 95% des cas) les glandes et est donc appelé adénocarcinome. La zone périphérique est à l'origine de la majorité des cancers (70%). Un moindre pourcentage de cancers se développe dans la zone de transition (10 à 20%) et plus faiblement dans la zone centrale (Erbersdobler *et al.*, 2004).

2. Le cancer de la prostate (CaP)

a- Epidémiologie

Le CaP est le second cancer le plus fréquent et la sixième cause de mortalité par cancer, chez les hommes dans le monde (GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10). Près des trois-quarts des cas de CaP répertoriés proviennent des pays développés.

Aux Etats-Unis, le CaP représente le cancer le plus fréquent et la seconde cause de mortalité par cancer, chez les hommes, avec un nombre de morts estimé à 28 170 en 2012 (**Figure 6** (Siegel *et al.*, 2012)). Cependant, les taux de mortalité diminuent depuis 1990 (Siegel *et al.*, 2012), reflétant les améliorations dans la détection précoce (Etzioni *et al.*, 2008) et dans l'efficacité des traitements.

Le CaP se situe également au premier rang des cancers en France et est la troisième cause de mortalité par cancer derrière le cancer du poumon et le cancer colorectal (Projection

INTRODUCTION

de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011. Rapport technique. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2011. 78 p.).

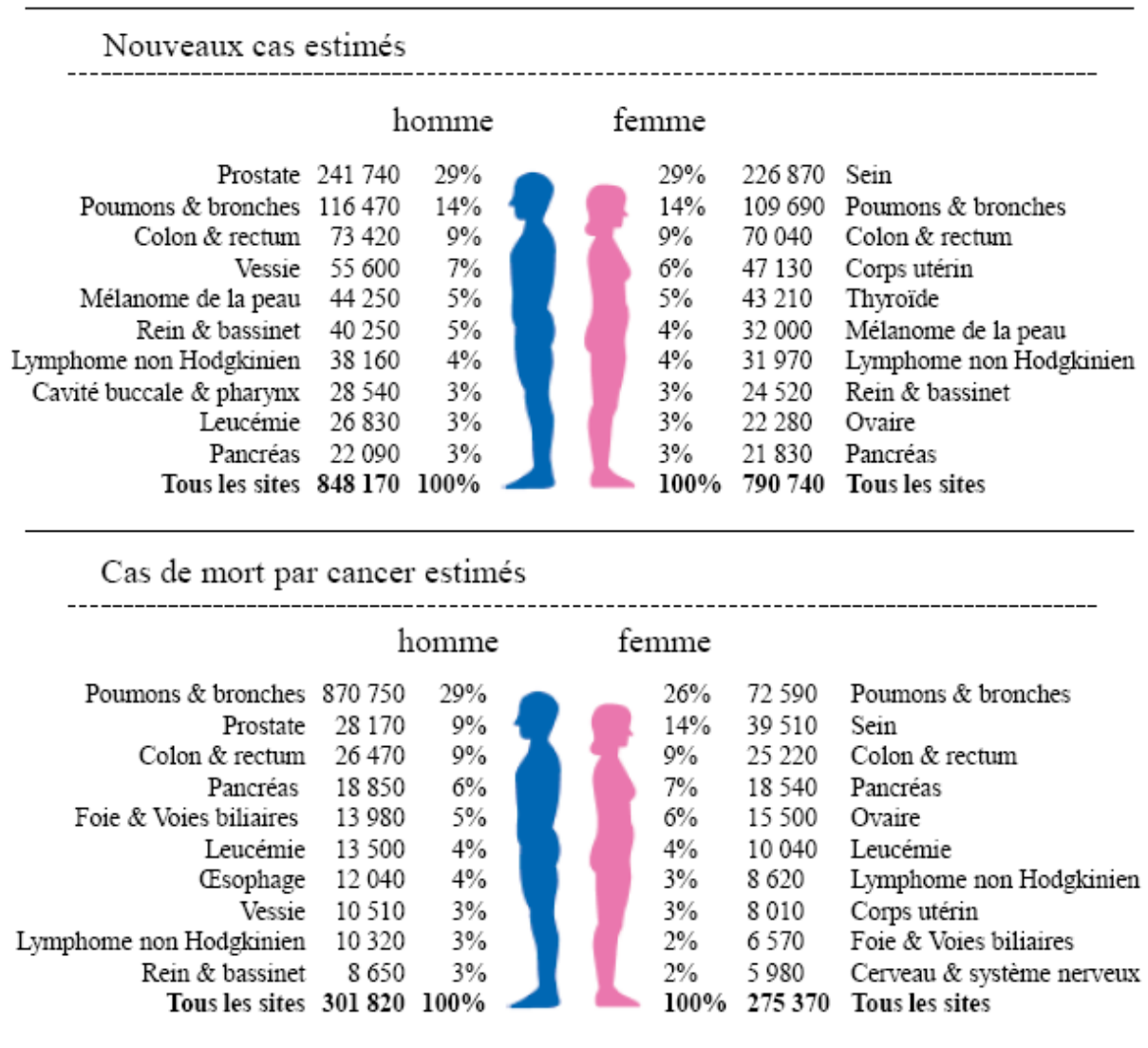


Figure 6 : Nouveaux cas de cancer et cas de mort par cancer, estimés en fonction du sexe.

Cette figure, modifiée à partir de Siegel *et al* (Siegel *et al.*, 2012), présente les 10 cancers les plus fréquents dans les nouveaux cas de cancer et les cas de mort par cancer, en fonction du sexe. Les chiffres correspondent à ceux estimés en 2012, aux Etats-Unis.

La probabilité de développer un cancer de la prostate est de 16,48%, soit un homme sur 6. Cependant, le cancer de la prostate, comme de nombreux cancers, se développe plus fréquemment à un âge élevé. La probabilité de développer un cancer de la prostate est de 0,1% avant 39 ans, 2,63% entre 40 et 59 ans, puis passe à 6,84% entre 60 et 69 ans et 12,54% après 70 ans (correspondant à 1 homme sur 8) (Siegel *et al.*, 2012).

b- Etiologie et origine du CaP

Les mécanismes responsables de l'initiation et de la progression du CaP ne sont pas entièrement connus. Actuellement, seul l'âge, l'existence d'antécédents familiaux de CaP ou de cancer du sein, et l'origine ethnique (notamment Afro-américaine et Antillaise) sont identifiés avec certitude comme étant des facteurs de risques pour le CaP. De plus, la participation de gènes de susceptibilité, de facteurs environnementaux, dont une alimentation riche en graisses animales et en viande rouge, de même que l'inflammation chronique favoriseraient l'initiation du cancer de la prostate. Bien que des facteurs de risque génétiques du CaP aient été identifiés, aucun d'eux n'est aussi fortement associé à la maladie que ceux présents dans le cancer du sein ou du côlon (Eeles *et al.*, 2009).

La néoplasie intra-épithéliale prostatique (PIN) a été reconnue comme une lésion précurseur du CaP. Il s'agit d'anomalies nucléo-cytoplasmiques présentes sur une seule assise cellulaire au niveau des glandes et des tubules de la prostate. Le CaP peut avoir comme origine cellulaire, les cellules basales et les cellules luminales de l'épithélium glandulaire ; l'origine cellulaire ne semble pas affecter la pathologie (Xin, 2012).

Le développement et l'homéostasie de la prostate ainsi que l'initiation et la progression du CaP sont dépendants de la signalisation androgénique. Dans le CaP, le rôle des androgènes et de AR est moins clair, bien que l'activité de AR module l'expression de gènes associés à la régulation du cycle cellulaire, la survie, la croissance et la formation de métastases (Knudsen *et al.*, 1998; Wang and Tindall, 2011; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2006) ou d'oncogènes (par exemple ERG *via* le gène fusion TMPRSS2/ERG (Tomlins *et al.*, 2008)), pouvant contribuer au développement de la tumeur. Bien qu'aujourd'hui, il soit admis que les androgènes sont importants dans la croissance de la tumeur (Huggins, 1946; Huggins and Hodges, 2002), le fait que les androgènes favorisent la carcinogenèse prostatique *in vivo* est sujet à controverse. En effet, l'administration de testostérone chez les hommes n'augmente pas l'incidence du CaP et il n'y a pas de corrélation entre la présence de CaP et le taux d'androgène dans le sérum (Isbarn *et al.*, 2009; Morgentaler, 2006). Il semble donc que l'action des androgènes soit en condition saturante pour la croissance androgéno-dépendante (Morgentaler and Traish, 2009). Les taux physiologiques des androgènes sont importants pour la prolifération cellulaire de la prostate normale ou tumorale mais un excès d'androgène seul

n'entraîne pas une prolifération cellulaire incontrôlée. Par contre, la voie de signalisation de AR semble jouer un rôle important dans l'initiation et la progression du CaP, en particulier lors d'une activation de la signalisation de AR indépendamment du ligand (qui sera expliquée plus en détail dans les paragraphes suivants) (Debes and Tindall, 2004; Dehm and Tindall, 2007; Heinlein and Chang, 2004).

c- Dépistage, détection et diagnostic du CaP

Actuellement, il n'existe pas de programme de dépistage organisé pour ce cancer, bien qu'il reste recommandé chez l'homme à partir de 50 ans et jusqu'à 75 ans, si l'espérance de vie est supérieure à 10 ans. Il est recommandé à partir de 45 ans chez les patients ayant des risques familiaux ou ethniques de CaP.

Le CaP est le plus souvent détecté par une élévation de la valeur du PSA sérique, une anomalie de consistance de la prostate identifiée par toucher rectal, ou plus rarement, sur un examen anatomo-pathologique du tissu prélevé lors du traitement d'une HBP.

Le PSA est le biomarqueur reconnu par la FDA (Food and Drug Administration) et utilisé dans la détection du CaP. Le seuil critique de PSA sérique était de 4ng/ml. Cependant, l'association urologique américaine (AUA) a mis à jour en 2009 les bonnes pratiques d'utilisation du PSA et ne mentionne plus de valeur seuil de PSA, mais conseille de baser la décision sur les résultats de PSA et de toucher rectal, ainsi que sur l'âge du patient, l'histoire familiale, l'ethnicité... (Greene *et al.*, 2009). La conférence consensus européenne de l'ESMO (European Society For Medical Oncology) recommande la réalisation de biopsies si le taux de PSA est \geq à 3ng/ml (Horwich *et al.*, 2013).

Le diagnostic positif du cancer de la prostate est établi par l'analyse anatomo-pathologique des biopsies échoguidées de prostate. Habituellement, au minimum 12 biopsies réparties sur l'ensemble du volume prostatique sont réalisées. Des biopsies négatives n'excluent pas la présence du CaP et le patient restera sous surveillance (PSA, biopsies...)

Le diagnostic précoce du cancer de la prostate a permis d'en diminuer la mortalité spécifique (Siegel *et al.*, 2012). Cependant, d'un point de vue clinique, les méthodes courantes de dépistage restent controversées (Andriole *et al.*, 2009; Schroder *et al.*, 2009). En effet, le PSA est spécifique à la prostate mais pas au cancer. Plus le taux de PSA est élevé, plus le risque de cancer est grand mais l'HBP, le toucher rectal, les biopsies, la prostatite et

toutes les causes d'irritation prostatique peuvent entraîner une augmentation du PSA. La valeur prédictive positive dans des études de dépistage (avec une valeur seuil à 3ng/ml) est d'environ 25%, ce qui signifie que 3 hommes sur 4 avec un test positif seront exposés à des examens supplémentaires inutiles tels que la biopsie prostatique (Horwich *et al.*, 2013). La valeur seuil optimale du PSA est donc difficile à définir, d'autant que les patients atteints de CaP peuvent également avoir des taux de PSA faibles (Thompson *et al.*, 2004).

Le PSA est un gène cible de AR (Riegman *et al.*, 1991) et les recherches pour identifier un nouveau marqueur potentiel du CaP se sont tournées vers l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la voie de signalisation de AR. Ainsi, d'autres gènes cibles de AR, tels que AMACR ou PCA3, sont utiles dans la détection du CaP (Bradford *et al.*, 2006). Le marquage immuno-histochimique de AMACR dans les biopsies permet de détecter des lésions cancéreuses de faible ampleur (Carswell *et al.*, 2006). Le dosage urinaire de PCA3 a été récemment approuvé par la FDA, comme outil de diagnostic chez les hommes avec un taux de PSA élevé et un résultat de biopsies négatif (Filella *et al.*, 2013).

d- Classification et valeur pronostique

Afin de classer et de définir un pronostic du CaP, plusieurs systèmes de classification des tumeurs existent, tenant compte de l'étendue de la tumeur (Stade TNM), de l'apparence histologique (Score de Gleason) ou d'un ensemble de plusieurs paramètres (Classification d'Amico).







• Stades TNM

Un système de classification identique pour tous les cliniciens et les pathologistes a été adopté par le comité «American Joint Committee on Cancer » (AJCC) pour définir les CaP en terme de stade. Il s'agit du système TNM (Tumor, Node, Metastasis). Il décrit l'extension de la tumeur primitive (stade T), l'absence ou la présence de métastases aux ganglions avoisinants (stade N) et l'absence ou la présence de métastases à distance (stade M). Cette classification permet d'estimer l'étendue de la tumeur et de prédire l'évolution de la maladie (**Figure 7**). Elle est revue tous les 5 ans (Edge and Compton, 2010).

Il existe une classification clinique (cTNM) et pathologique (pTNM). Le cTNM s'appuie sur les données disponibles (examen clinique, biopsies) avant la réalisation du traitement. Elle permet d'aider au choix du traitement. La classification pTNM tient compte

des renseignements supplémentaires apportés par le geste chirurgical et l'examen histopathologique de la pièce opératoire. La définition du pN implique une exérèse appropriée des ganglions concernés. La classification pM implique un examen histologique des foyers métastatiques. La classification pathologique est utilisée pour décider du choix d'un traitement adjuvant et ré-évaluer le pronostic.

Tumeur primaire

TX	Tumeur primitive non évaluée	
T0	Pas de tumeur primaire	
T1	Tumeur ni palpable, ni visible en imagerie	
T1a	< 5% du tissu réséqué	
T1b	> 5% du tissu réséqué	
T1c	découverte sur biopsie en raison de l'élévation du PSA	
T2	Tumeur confinée à l'organe	
T2a	unilatérale, la moitié ou moins d'un côté	
T2b	unilatérale, plus de la moitié d'un côté	
T2c	bilatérale	
T3	Extension extra-prostatique	
T3a	extension extra-prostatique ou invasion microscopique du col de la vessie	
T3b	invasion des vésicules séminales	
T4	Invasion du rectum, du muscle élévateur et/ou de la paroi pelvienne	

Ganglions lymphatiques régionaux

NX	Ganglions régionaux non testés
N0	Pas de ganglions régionaux positifs
N1	Métastases dans les ganglions régionaux

Métastases distantes

M0	Pas de métastases distantes
M1	Métastases distantes
M1a	Ganglions lymphatiques non régionaux
M1b	Os
M1c	Autres sites avec ou sans maladie des os

Figure 7 : Classification TNM des tumeurs de la prostate.

Classification selon l'AJCC (American Joint Committee on Cancer), d'après les dernières modifications (Edge and Compton, 2010). Images modifiées à partir de *cancer.gov* (National Cancer Institute).

• Score de Gleason

Lorsqu'un cancer de la prostate est diagnostiqué, le système de gradification le plus fréquemment utilisé est le grade de Gleason. Ce système de gradient proposé par Gleason en 1966 (Gleason, 1966) a évolué (Gleason, 1992), avant d'être ré-évalué lors d'une conférence consensus (Epstein *et al.*, 2005).

Son échelle va de 1 à 5, en fonction de l'architecture de la tumeur (**Figure 8**). Le grade 1 correspond à un carcinome bien différencié, où les glandes tumorales diffèrent peu des glandes normales et le grade 5 à un carcinome indifférencié ne présentant plus la morphologie, ni les fonctions sécrétoires normales.

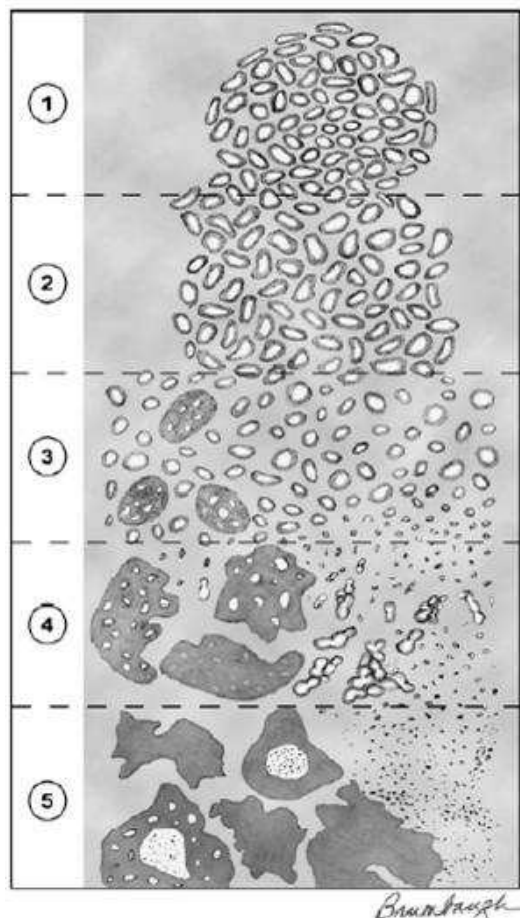


Figure 8 : Grades de Gleason.

Il existe 5 grades architecturaux allant du grade 1, pour un tissu prostatique le plus différencié, au grade 5 correspondant au tissu le moins différencié. Figure modifiée d'après Epstein *et al* (Epstein *et al.*, 2005).

Les 5 grades architecturaux de Gleason sont les suivants :

- Grade 1 : Prolifération de glandes simples rondes, régulières.
- Grade 2 : Aspect plus infiltrant avec des glandes arrondies, légèrement tassées.

- Grade 3 : Infiltration de glandes tumorales entre les glandes et canaux normaux. Glandes irrégulières, plus petites et espacées. Quelques masses cribriformes (percées de nombreux trous) seulement si elles sont bien définies, ovoïdes ou rondes et de taille similaire aux autres glandes.
- Grade 4 : Perte de glandes individuelles. Glandes petites, moyennes ou grandes (fusionnées). Masses cribriformes et certaines tumeurs ressemblent aux hypernéphromes.
- Grade 5 : Aucune différenciation glandulaire. Les cellules s'organisent en nappe, travée ou cellules isolées. On observe des comédocarcinomes (massif plein ou cribriforme avec nécrose au centre).

Compte tenu de l'hétérogénéité fréquente des carcinomes prostatiques, les deux grades les plus représentés lors de l'analyse anatomo-pathologique sont ajoutés pour définir le score de Gleason. Ce score varie donc de 2 à 10. Il a été décidé que lors des biopsies, les grades 1 et 2 devraient être rarement diagnostiqués, s'ils le sont (Epstein *et al.*, 2005). On distingue particulièrement 5 groupes de pronostic, du meilleur au plus mauvais : Score de Gleason ≤ 6 , Score de Gleason $3+4 = 7$, Score de Gleason $4+3 = 7$, Score de Gleason $4+4 = 8$ et Score de Gleason 9-10 (Pierorazio *et al.*, 2013).

Le système de score de Gleason a été classé catégorie 1 des facteurs de pronostic par le collège des Pathologistes Américains en 2005 (Srigley *et al.*, 2005).

• Classification de D'Amico

La classification de D'Amico est utilisée, comme facteur pronostic, pour définir le risque de récurrence après traitement local de tumeurs localisées. Cette classification est définie en fonction de la valeur du PSA, du stade clinique et du score de Gleason. On distingue trois niveaux de risque de récurrence biochimique, 10 ans après un traitement local, correspondant à trois groupes pronostiques :

- Faible risque : stade clinique $\leq T2a$ et score de Gleason ≤ 6 et PSA sérique < 10 ng/ml.
- Risque intermédiaire : stade clinique = $T2a$ ou score de Gleason = 7 ou PSA sérique compris entre 10 et 20 ng/ml.
- Haut risque : stade clinique = $T2c - T3a$ ou score de Gleason > 7 ou PSA sérique > 20 ng/ml.

3. Traitements du CaP

Les stratégies thérapeutiques sont définies en fonction des caractéristiques du cancer (le stade TNM, le score de Gleason et la classification de D'Amico pour les tumeurs localisées) mais également du taux initial de PSA, du volume de la prostate, des caractéristiques du patient (âge, comorbidité, existence de troubles mictionnels) et des préférences du patient dans le cas où il existe des alternatives thérapeutiques présentant un rapport bénéfice / risque équivalent.

a- Surveillance active

Le surtraitement est un problème sérieux chez les patients diagnostiqués avec un cancer de la prostate, en particulier chez les patients asymptomatiques diagnostiqués par le suivi du PSA (Horwich *et al.*, 2013). La prostatectomie radicale est associée à des complications, à long terme, des fonctions urinaires et érectiles (Steineck *et al.*, 2002). Afin de réduire le surtraitement, une absence thérapeutique peut être envisagée pour les hommes ayant une espérance de vie supérieure ou égale à 10 ans, peu de biopsies positives et un CaP à faible risque d'évolution d'après la classification de D'Amico (Horwich *et al.*, 2013). Elle nécessite toutefois une surveillance étroite durant plusieurs années (toucher rectal, dosages répétés du PSA et nouvelles biopsies prostatiques). Le principe consiste à ne débiter le traitement qu'en cas de signe d'évolution.

b- Chirurgie

La prostatectomie radicale est le traitement de référence des tumeurs cliniquement localisées, de risque faible ou intermédiaire, selon la classification de D'Amico. La limite d'âge de 75 ans est habituellement retenue. Le geste chirurgical consiste en l'exérèse de la prostate, des vésicules séminales et dans certains cas des ganglions lymphatiques régionaux. L'examen anatomo-pathologique de la pièce de prostatectomie radicale permet de confirmer les caractéristiques du cancer et d'apporter des informations essentielles (siège de la tumeur,

type histologique, score de Gleason, extension de la tumeur, état des limites chirurgicales et état des ganglions régionaux) pour le pronostic (Soulie *et al.*, 2004).

c- Radiothérapie

La radiothérapie externe peut également être utilisée comme premier traitement du CaP localisé ou localement avancé. Elle est proposée en alternative à la prostatectomie, notamment chez les patients de plus de 70 ans (Rosenthal and Sandler, 2010). Sa durée moyenne est de 7 à 8 semaines et les séances sont quotidiennes. La curiethérapie, qui consiste en une implantation de graines radioactives dans la glande prostatique peut aussi être utilisée pour traiter un CaP cliniquement localisé (Gomez-Iturriaga Pina *et al.*, 2010).

d- Nouvelles thérapeutiques locales

De nouvelles thérapeutiques locales moins invasives ont été utilisées dans le traitement de l'HBP et sont attractives pour le traitement des CaP, en alternative à la prostatectomie radicale, la radiothérapie ou la surveillance active (Lindner *et al.*, 2010; Srigley *et al.*, 2012). La cryothérapie, la thermothérapie micro-ondes, la thérapie par ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) et la thérapie photodynamique ont déjà été utilisées pour le traitement du CaP. L'ablation par laser interstitiel est actuellement en cours de développement.

e- Hormonothérapie

L'hormonothérapie, qui est une thérapie par privation en androgènes (ADT), est fréquemment utilisée pour traiter les patients avec un CaP localement avancé ou métastatique. Elle n'est pas utilisée en première ligne de traitement des cancers localisés mais peut être utilisée avec la radiothérapie pour les cancers localisés à risque intermédiaire ou à haut risque d'après la classification de D'Amico.

Cette approche exploite la nature androgéno-dépendante d'un adénocarcinome prostatique. Historiquement, l'ADT impliquait la castration physique (orchidectomie) et/ou l'utilisation d'œstrogènes (Crawford, 2004). Plus récemment, le blocage androgénique se fait

par une castration chimique, utilisant des agonistes de la LHRH et des anti-androgènes (Brawer, 2006). Les analogues de la LHRH (Buséreléline, Triptoréline, Leuproléine, Goséreléline) sont utilisés en première intention. Ils agissent en stimulant de façon continue les récepteurs de la LHRH, entraînant la désensibilisation des récepteurs et donc l'arrêt de la sécrétion de LH et par conséquent des androgènes. Les anti-androgènes non stéroïdiens (Flutamide, Bicalutamide, Nilutamide) agissent en bloquant le récepteur aux androgènes. Les anti-androgènes stéroïdiens (acétate de Cyprotérone) bloquent la sécrétion de LH hypophysaire ainsi que le récepteur aux androgènes. Les anti-androgènes s'utilisent, généralement, associés aux analogues de la LHRH.

f- Chimiothérapie

La chimiothérapie était traditionnellement utilisée pour les patients avec un CaP métastatique résistant à l'hormonothérapie (CRPC : Castration Resistant Prostate Cancer), expliqué plus en détail dans les paragraphes suivants. Une variété d'agents chimiothérapeutiques ont été employés, incluant ces dernières années des médicaments tels que mitoxantrone, etoposide, cistplatine, vinblastine-est-ramustine, taclitaxel et docetaxel (Srigley *et al.*, 2012). En général, peu ou pas d'effets positifs sur la survie ont été observés. Le docetaxel est la chimiothérapie de première ligne actuellement recommandée.

En cas de reprise évolutive après docétaxel, de nouveaux traitements sont disponibles. Ces nouveaux agents ciblant l'axe de AR (dont l'inhibiteur de la biosynthèse des androgènes, l'abiratéron, et l'anti-androgène, l'enzalutamide) ou non (comme le nouveau taxoïde (le carbazitaxel), l'immunothérapie par sipuleucel-T ou l'oligonucléotide anti-sens OGX-011 (custirsén)), augmentent la survie dans des études de phase III pour des patients atteints de CRPC (Mukherji *et al.*, 2012; Schrijvers *et al.*, 2010; Shiota *et al.*, 2013).

4. Evolution du CaP

Le CaP évolue inexorablement, bien que sa croissance soit très lente, vers une forme plus agressive, métastatique et létale (le temps moyen pour passer d'une tumeur de 0,5 cm³ à 4cm³ est d'environ 12 ans) (Adolfsson *et al.*, 1994; Chodak, 1994; Johansson, 1994).

a- Rechute des cancers localisés

Après traitement à visée curative, un suivi clinique (toucher rectal, dans le cas d'une radiothérapie) et biochimique (dosage du PSA) régulier est effectué (Horwich *et al.*, 2013).

Dans les 3 à 6 semaines après la prostatectomie radicale, le PSA devient indétectable. Un dosage du PSA, 1 à 3 mois après la chirurgie est recommandé et doit être $< 0,1$ ng/ml. Le patient est en rémission complète si le taux de PSA est $< 0,1$ ng/ml pendant au moins 7 ans. La rechute biochimique des patients ayant suivi un traitement à intention curative est observée dans 30 à 40% des cas, dans les dix ans après prostatectomie (Freedland *et al.*, 2005). Elle est définie à une valeur de PSA $> 0,2$ ng/ml (Nelson and Lepor, 2003). Une faible augmentation du niveau de PSA peut être significative et les patients doivent suivre une radiothérapie dès que la défaillance biochimique est établie (Horwich *et al.*, 2013). Le dilemme est alors de déterminer si la rechute est locale ou métastatique. Certains facteurs tels qu'un score de Gleason bas, un temps long avant la rechute biochimique et un temps long de doublement du PSA sont indicatifs d'une rechute locale (Han *et al.*, 2001).

Après radiothérapie, la rechute locale est contrôlée par biopsie prostatique. Le taux de PSA (défini à 2 ng/ml) après irradiation permet de juger de l'efficacité ou de l'échec du traitement (Roach *et al.*, 2006). Lorsqu'il y a rechute, d'autres approches peuvent être utilisées (cryothérapie, HIFU, thérapie photodynamique, thermothérapie).

La thérapie par privation en androgènes (ADT) peut être utilisée dans le cas d'une rechute suivant la prostatectomie radicale ou la radiothérapie, directement ou après apparition des métastases. Il ne semble pas y avoir de bénéfice à la survie, bien que le temps d'apparition des métastases soit retardé par un traitement androgénique précoce (Moul *et al.*, 2004).

b- Echappement hormonal

La thérapie par privation en androgènes (ADT) est initialement fortement effective contre le CaP. Cependant, les cancers hormono-dépendants, tels que le CaP et le cancer du sein peuvent évoluer vers l'hormono-résistance (Clarke, 2006). L'échappement hormonal correspond à l'évolution progressive de la maladie malgré le traitement anti-hormonal, celui-ci ne contrôlant plus la croissance tumorale. Le patient développe alors un CaP résistant à la castration (CRPC), invariablement fatal.

L'efficacité clinique de l'ADT dans les CaP avancés dure de quelques semaines à plusieurs années, avec un temps global médian de 18 à 30 mois (Crawford *et al.*, 1989; Denis *et al.*, 1998; Eisenberger *et al.*, 1998). Bien que l'ADT et les nouvelles thérapies additionnelles ciblant l'activité de AR, telles que l'abiratérone ou l'enzalutamide (MDV3100), prolongent la survie (Mukherji *et al.*, 2012), les réponses à long terme ou les guérisons sont extrêmement rares. Pour contrôler la réponse à l'ADT, le dosage du PSA sérique est largement utilisé, bien qu'il n'ait pas de validité clinique en tant que réponse prédictive à cette thérapie (Small and Roach, 2002; Smith *et al.*, 1997; Vicini *et al.*, 2005).

5. Mécanismes du développement du cancer de la prostate résistant à la castration

Ces dernières années, des analyses génétiques et protéiques des tumeurs CRPC, ainsi que le séquençage de transcrits de AR, ont révélé plusieurs mécanismes expliquant la survenue de la résistance : soit AR est réactivé pendant l'ADT, soit le taux d'androgènes intratumoral est maintenu à un niveau suffisant pour activer AR (**Figure 9**).

a- Réactivation de AR

- **Augmentation de l'expression de AR / amplification de AR**

La grande majorité des patients atteints de CRPC présentent une forte expression de AR, en ARNm et en protéine (Edwards *et al.*, 2003; Ford *et al.*, 2003; Linja *et al.*, 2001; Visakorpi *et al.*, 1995). Pour presque 1/3 des CRPC, l'augmentation d'expression de AR résulte de l'amplification du locus de AR lui-même. D'autres mécanismes conduisant à la réactivation de AR sont moins connus mais peuvent inclure une augmentation du taux de transcription, ou une stabilisation de l'ARNm ou de la protéine. L'activation de AR permet de contourner l'ADT et d'affaiblir les capacités antagonistes du bicalutamide (Chen *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005; Knudsen and Penning, 2010; Stanbrough *et al.*, 2001).

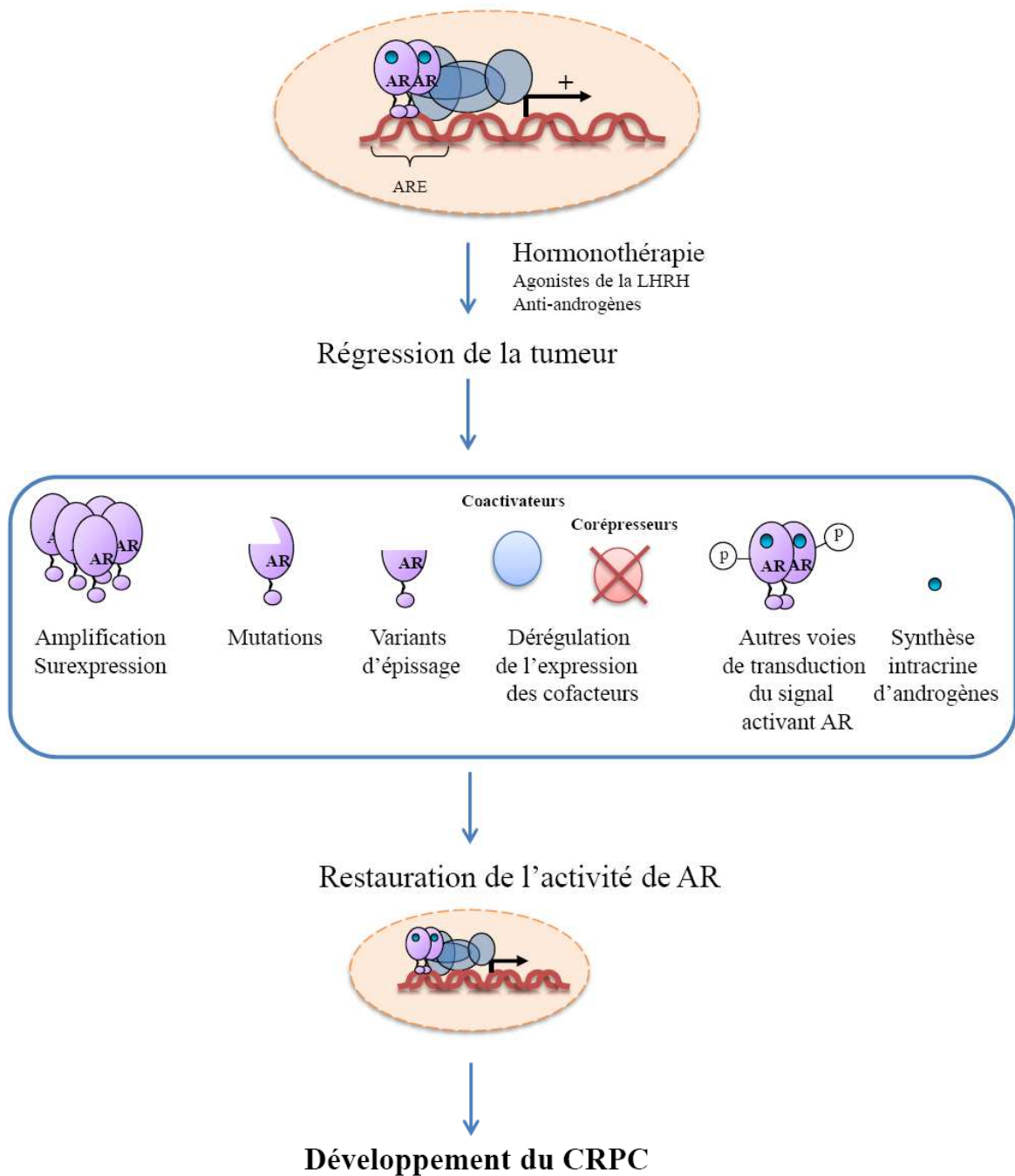


Figure 9 : Mécanismes moléculaires du développement du cancer de la prostate résistant à la castration.

L'hormonothérapie entraîne une régression de la tumeur. Cependant, le cancer évolue vers une forme résistante à la castration (CRPC). Le développement d'un CRPC est marqué soit par une augmentation d'expression de AR, des mutations ou des variants d'épissages altérant la spécificité ou la nécessité de la liaison du ligand, une dérégulation de l'expression des cofacteurs, une activation de AR par d'autres voies de transduction du signal ou une synthèse intracrine d'androgènes. Figure modifiée à partir de Knudsen and Penning (Knudsen and Penning, 2010)

- **Altérations dans la spécificité de liaison ou l'accrochage du ligand**

Bien que la fréquence des mutations de AR dans les tumeurs CRPC soit faible (8-25%), il est clair que des mutations spécifiques sont sélectionnées par un sous-ensemble de tumeurs et que ces mutations peuvent entraîner la progression des CRPC.

Plusieurs études ont révélé un nombre d'altérations de AR, qui peuvent soit élargir le spectre de ligands (qui fonctionnent alors comme agonistes de AR), soit contourner la nécessité de la liaison du ligand.

Un grand nombre de mutations somatiques de AR, entraînant une activation du récepteur par un faible taux d'androgènes surréniaux et d'autres hormones stéroïdiennes, incluant la DHEA, la progestérone, les œstrogènes et le cortisol ont été identifiées (Culig *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2000). D'autres mutations transforment des antagonistes de AR en agonistes potentiels (Berrevoets *et al.*, 1993).

Des mutations dans trois zones du LBD et de la région charnière de AR semblent entraîner ces différentes propriétés (Green *et al.*, 2012) :

- Des mutations dans les codons de la région 701-730 élargissent la spécificité de ligand aux androgènes surréniaux, aux glucocorticoïdes et à la progestérone ;
- Des mutations dans les codons de la région 874-910, dans la région AF-2, convertissent les antagonistes en agonistes (par exemple T877A) ;
- Des mutations dans le codon 670-678 dans la région charnière et le LBD entraînent une augmentation de la sensibilité à la DHT.

Plusieurs variants d'épissage de AR sont également capables de contourner la dépendance au ligand (Green *et al.*, 2012). Ces variants d'épissage ont en commun une perte des portions du LBD C-terminal, formant un AR constitutivement actif (Jenster *et al.*, 1995).

- **Altérations dans le recrutement des cofacteurs**

Des mutations dans d'autres régions que le LBD peuvent aussi altérer le recrutement des cofacteurs (Brooke and Bevan, 2009). De plus, une dérégulation de l'expression de coactivateurs ou corépresseurs de AR peuvent entraîner une activité aberrante de AR. Il a été observé un gain d'expression de certains coactivateurs ou une perte d'expression de certains

corépresseurs dans les CRPC, pouvant alors compenser un environnement pauvre en hormone (Green *et al.*, 2012).

- **Activation de AR par d'autres voies de transduction du signal**

L'activation de plusieurs voies de transduction du signal dans les CRPC augmente l'activité de AR, directement ou *via* des coactivateurs, dans un environnement où les taux d'androgènes sont faibles ou même absents (Green *et al.*, 2012). Les voies de signalisation de EGF, IGF, IL-6, Wnt et Stat5a/b, ainsi que certaines kinases comme CDK1, PKA, PI3K/Akt et les Ras-Raf-MAP kinases activent l'activité de AR en réponse à de faibles taux d'androgènes. Les voies Ras-Raf-MAPK et PI3kinase/Akt sont également activées dans les CaP primaires agressifs ou les CRPC. En général, ces voies impliquant des kinases augmentent l'activité de AR en phosphorylant ses coactivateurs, suggérant que les interactions entre voies de signalisation jouent un rôle important dans la progression du CaP, dans un environnement sans androgène.

b- Métabolisme androgénique

Plusieurs études ont démontré que le taux d'androgènes dans les tumeurs est maintenu à un taux suffisant pour activer la voie de signalisation de AR. Une hypothèse est que les voies de synthèse des stéroïdes ont une réponse adaptée à l'ADT, facilitant la survie des tumeurs CRPC dans un environnement faible en androgènes exogènes. Le maintien du taux d'androgènes intratumoral peut résulter, soit de la biosynthèse intracrine intratumorale d'hormones stéroïdiennes, soit de la consommation et conversion d'androgènes surréniaux, ou encore potentiellement d'une nouvelle synthèse des stéroïdes (Green *et al.*, 2012).

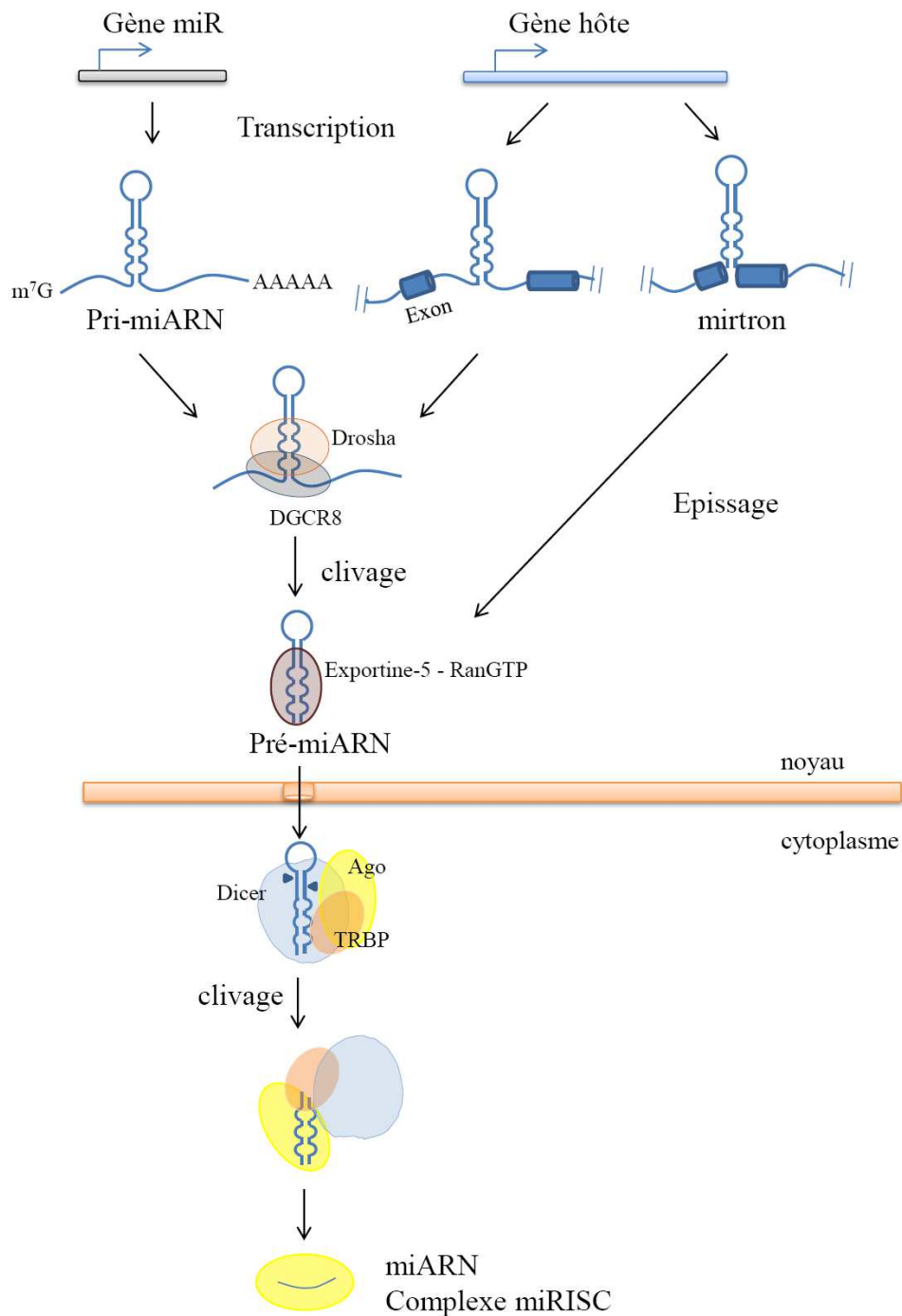


Figure 10 : Biogenèse des miARNs.

Le gène miR est transcrit dans le noyau en un transcrit primaire appelé pri-miARN. La structure tige-boucle du pri-miARN est reconnue et excisée par un complexe nucléaire composé de la RNase III Drosha et de son partenaire DGCR8, générant ainsi le pré-miARN (voie canonique). Alternativement, quelques pré-miARNs constituant de courts introns sont générés directement par épissage (mirtrons). Le pré-miARN est exporté dans le cytoplasme par l'Exportine 5-RanGTP, où il est reconnu par un complexe composé de la RNase III Dicer et TRBP. Dicer clive le pré-miARN de manière à éliminer la boucle et générer un duplex miARN:miARN*. La présence préalable ou le recrutement d'une protéine Ago permet de former le complexe RISC, activé par l'élimination du brin « passager », le miARN*. Le complexe miRISC formé va ensuite se fixer sur l'ARNm cible et réguler l'expression protéique. Modifiée d'après Kim *et al* (Kim *et al.*, 2009).

III. Les microARNs

Les microARNs (miARNs) sont des petits ARNs non codant d'environ 22 nucléotides qui apportent un niveau supplémentaire de régulation de l'expression génique, en régulant négativement l'expression de gènes cibles de façon post-transcriptionnelle. Ils se fixent au niveau de la 3'UTR des ARNm et induisent principalement une dégradation de l'ARNm ou une inhibition de la traduction.

1. Biogenèse des miARNs

Les étapes de la biogenèse des miARNs, présentées dans la **Figure 10**, sont décrites en détail dans les paragraphes suivants.

a- Organisation génomique - Gènes miR

Dans le génome humain, les miARNs sont répartis dans tous les chromosomes, à l'exception du chromosome Y. Les miARNs peuvent être intergéniques (situés entre deux gènes), introniques ou exoniques (respectivement, dans l'intron ou l'exon d'un gène hôte) (**Figure 11**) (Kim *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2004; Saini *et al.*, 2008).

Un miARN peut être le produit de la transcription d'un gène miR possédant sa propre unité de transcription (miARNs intergéniques, exoniques et certains introniques) ou être le produit d'épissage d'un gène hôte (codant ou non) pour les miARNs introniques. Un cas particulier de miARN intronique est le mirtron (**Figure 11**), pour lequel la séquence entière de l'intron d'un gène codant pour une protéine correspond à la séquence exacte du pré-miARN (Ruby *et al.*, 2007). Quelques variants des mirtrons ont été identifiés avec des extensions de séquence au niveau d'une des deux terminaisons (mirtrons à queue 5' ou queue 3'; **Figure 11** (Babiarz *et al.*, 2008)). Les miARNs résultant de l'épissage partagent le même promoteur que leur gène hôte et ont souvent le même profil d'expression (Baskerville and Bartel, 2005).

Les miARNs sont organisés soit en unités indépendantes, soit en clusters. Lorsque les clusters de miARNs sont sous le contrôle d'un même promoteur, ils sont appelés miARNs polycistroniques.

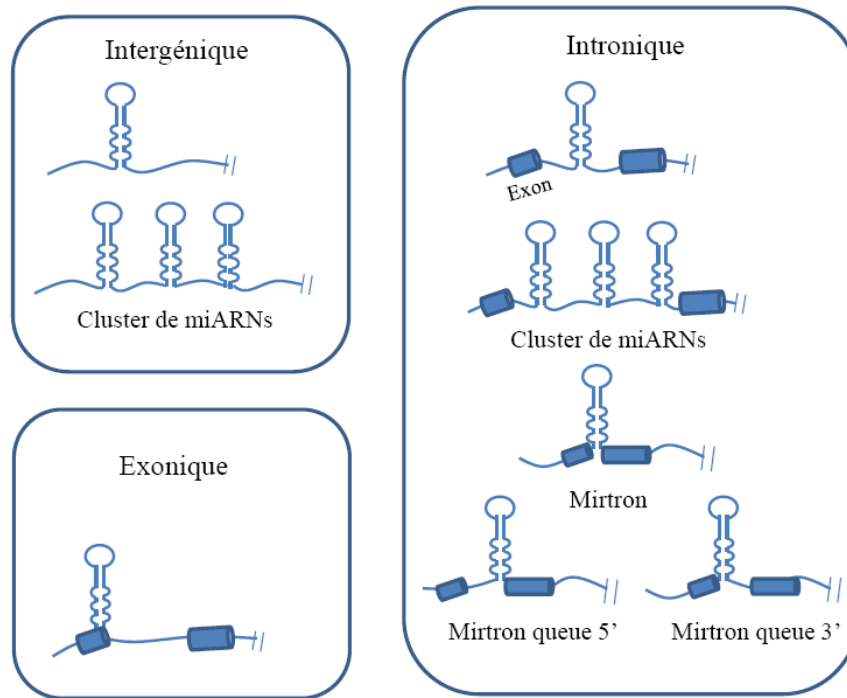


Figure 11 : Organisation génomique des miARNs.

Les miARNs sont intergéniques, introniques ou exoniques. Les miARNs sont produits par les gènes miR, qui possèdent leur propre promoteur, ou par épissage du gène hôte. Ils sont indépendants ou organisés en clusters. Un cas particulier de miARN intronique est le mirtron, pour lequel la séquence entière de l'intron d'un gène codant pour une protéine correspond à la séquence exacte du pré-miARN. Figure modifiée d'après UI Hussain (UI Hussain, 2012).

b- Transcription des gènes miR : les pri-miARNs

La plupart des gènes miR sont transcrits par l'ARN polymérase II (Lee *et al.*, 2004), produisant des long transcrits primaires appelés pri-miARNs. La transcription de ces gènes étant réalisée par la même enzyme en charge de la transcription des gènes codant une protéine, la régulation de ces mécanismes pourrait être similaire (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). La présence de régions promotrices dans les gènes miR a été prédite *in silico* par la recherche des sites de début de transcription (TSS) et de motifs de liaison de facteurs de transcription (Megraw *et al.*, 2006; Saini *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007). De plus, des séquences TSS potentielles des miARNs ont été localisées et caractérisées par des analyses génomiques ou de séquençage à haut débit (Bhattacharyya *et al.*, 2012; Chien *et al.*, 2011; Marson *et al.*, 2008; Ozsolak *et al.*, 2008). Les résultats obtenus des expériences sur les TSS sont disponibles dans la base de données suivante : <http://mirstart.mbc.nctu.edu.tw/>.

Comme pour les ARN messagers (ARNm), les pri-miARNs sont composés d'une coiffe en 5' (7-méthylguanosine) et d'une queue polyA en 3' (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004) et contiennent une ou plusieurs structures typiques, appelées tige-boucles, selon s'ils sont ou non polycistroniques. La structure d'un pri-miARN est donc formée d'une tige d'environ 33 nucléotides, reliée d'un côté par une boucle et se terminant, de l'autre côté, par des séquences simple-brin à la base de la tige.

c- Clivage du pri-miARN en pré-miARN

Les transcrits primaires sont clivés dans le noyau par un complexe protéique composé de la ribonucléase Drosha, associée à son cofacteur DGCR8 (Gregory *et al.*, 2004).

Le complexe Drosha contient d'autres facteurs tels que EWSR1, FUS, de nombreuses ribonucléoprotéines (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs)) et les hélicases DEAD-box p68(DDX5) et p72 (DDX17). Les rôles de ces composants sont encore mal connus, mais il a été montré que certaines hnRNPs et DEAD-box (p68/p72) peuvent augmenter le recrutement et l'activité de Drosha (Fukuda *et al.*, 2007; Guil and Caceres, 2007). DGCR8, qui interagit avec l'ARN double brin, est requis pour permettre la liaison du complexe Drosha/DGCR8 au pri-miARN, à la jonction entre les séquences simple brin de la base de la tige et la structure tige-boucle. Une fois le complexe lié au pri-miARN, DGCR8 spécifie la distance de clivage de Drosha (environ 11 paires de base), à partir de la jonction séquence simple brin/ tige-boucle. L'enzyme Drosha est une ribonucléase de classe 2, qui contient deux domaines RNase III et un domaine de liaison à l'ARN double brin. Cette structure permet donc un clivage asymétrique de l'ARN double brin et la libération d'une structure tige-boucle plus petite, d'environ 60 -70 nucléotides, appelée pré-miARN (Lee *et al.*, 2003). Ce précurseur contient généralement une extrémité 3' simple brin (Han *et al.*, 2006). Des travaux ont montré que ce clivage serait généralement concomitant à la transcription (Morlando *et al.*, 2008).

Pour les miARNs introniques, une autre voie de biogenèse du pré-miARN existe, la voie mirtron, couplée au mécanisme d'épissage du gène hôte (Ruby *et al.*, 2007). Après l'épissage, les introns sont libérés et peuvent former une structure tige-boucle de pré-miARN. Dans ce cas, les mécanismes de maturation du mirtron passent outre le clivage par Drosha. Les extrémités 5' et 3' du pré-miARN correspondent aux sites d'épissage donneur et accepteur, respectivement. Cette voie mirtron, d'abord décrite chez les invertébrés D.

melanogaster et *C. elegans* (Okamura *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007), a ensuite été mise en évidence chez les mammifères (par exemple pour miR-877 et miR-1224) (Berezikov *et al.*, 2007).

d- Export du pré-miARN vers le cytoplasme

L'export nucléaire des pré-miARNs dépend principalement d'un récepteur appelé Exportine-5 (Exp-5) (Lund *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2005). Ce récepteur, découvert en 2002, appartient à la famille des karyophérines bêta. Comme tous les autres récepteurs de cette famille, il se fixe directement et spécifiquement à la protéine RAN-GTP dans le noyau et se lie alors aux nucléoporines, pour permettre le transfert du pré-miARN du noyau au cytoplasme (Brownawell and Macara, 2002). Exp-5 interagit spécifiquement avec des ARNs de plus de 14 paires de base qui contiennent une extrémité 3' protubérante (Gwizdek *et al.*, 2003), d'où sa spécificité de liaison aux pré-miARNs (Zeng and Cullen, 2004). Une fois que le complexe pré-miARN/Exp-5/RAN-GTP est assemblé et lié aux nucléoporines, il passe à travers les pores nucléaires. L'enzyme RAN-GAP, localisée du côté cytoplasmique des pores, active alors l'hydrolyse du RAN-GTP en RAN-GDP (Kehlenbach *et al.*, 1999), conduisant à la libération du pré-miARN dans le cytoplasme.

e- Formation du miARN mature

Précédemment décrite dans la biogenèse des ARN interférents (siARNs) (Bernstein *et al.*, 2001), Dicer est impliquée dans le clivage final des pré-miARNs en miARNs de 18 à 25 nucléotides (Lee *et al.*, 2002). C'est une ribonucléase de type III composée de deux domaines RNase, un domaine de liaison à l'ARN double brin, une signature PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) et un domaine hélicase. Le domaine PAZ permet à Dicer de reconnaître l'extrémité 3' du pré-miARN (Ma *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2003) et le domaine de liaison à l'ARN double brin permet la reconnaissance de la tige (Zhang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004). Le domaine PAZ est séparé des deux domaines RNases III d'environ 22 nucléotides, permettant à Dicer de couper la boucle et de former un duplex. Ce clivage génère une autre extrémité 3' simple brin.

Durant cette étape de maturation, deux autres protéines, TRBP et Argonaute 2 (Ago2), sont impliquées, avec Dicer, dans la formation d'un complexe de chargement RISC (Chendrimada *et al.*, 2005; Gregory *et al.*, 2005; Maniataki and Mourelatos, 2005). La plupart des études réalisées *in vitro* ont révélé que l'association de ces trois seules protéines (Dicer, TRBP et Ago2) forme un complexe équistochiométrique capable de cliver le pré-miARN et de sélectionner un des deux brins du duplex pour former le miRISC.

Le duplex d'ARN obtenu après maturation contient deux extrémités 3' simple brin résultant de l'action de Drosha et Dicer. Dans certains cas, les deux brins du duplex peuvent s'accumuler dans la cellule (Mourelatos *et al.*, 2002), chaque brin agissant comme brin mature pour guider les miRISCs vers les ARNm cibles (Okamura *et al.*, 2008). Néanmoins, la plupart du temps, seulement un des deux brins est sélectionné, le brin mature qui correspond généralement au miARN présent sur le brin 5' du pré-miARN (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Ce brin possède une extrémité 5' moins stable thermodynamiquement, c'est-à-dire avec une énergie de liaison du duplex plus faible sur 4 paires de base (Khvorova *et al.*, 2003). En effet, cette instabilité thermodynamique facilite la dissociation du duplex par les hélicases telles que Gemin3 (Mourelatos *et al.*, 2002) ou RCK/p54 (Chu and Rana, 2006), ou directement par le domaine hélicase de Dicer (MacRae *et al.*, 2008). Historiquement, on pensait qu'uniquement le brin 5' était fonctionnel tandis que le brin 3', brin passager, était dégradé, comme pour les siARNs (Leuschner *et al.*, 2006; Rand *et al.*, 2005). Cependant, des études ont maintenant montré que certains précurseurs forment des miARNs matures à partir des deux brins, de fonctionnalité équivalente, même si le brin 3' est présent en plus faible quantité (Okamura *et al.*, 2008).

f- Formation du complexe miRISC

Après dissociation des deux brins, le complexe RISC permet le chargement du miARN mature dans le miRISC. Parmi les trois protéines qui prennent place dans ce complexe (Dicer, TRBP et Ago), seul le composé Ago est requis pour l'activité RISC. Les protéines Argonautes sont composées de deux régions principales : une contenant le domaine PAZ en N-terminal, l'autre contenant le domaine Mid et PIWI (Yuan *et al.*, 2005). Bien que les fonctions de ces domaines soient encore mal définies, il semble qu'ils jouent un rôle important dans le phénomène d'interférence. En effet, le domaine PAZ, similaire à celui de Dicer, se lie au duplex d'ARN contenant deux nucléotides non pairés en 3' et reconnaît alors l'extrémité 3'

des miARNs matures (Lingel *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2003). Le domaine Mid reconnaît l'extrémité 5' phosphate des miARNs matures et aussi la coiffe m7G des ARNm (Boland *et al.*, 2010; Djuranovic *et al.*, 2010). Enfin, le domaine PIWI contient une structure tertiaire spécifique de la famille des RNases H, permettant l'activité endonucléasique du RISC.

Le complexe miRISC est guidé par le miARN sur la 3'UTR d'ARNm cibles, conduisant à une diminution du taux de protéines cibles.

2. Nomenclature

Les miARNs ont été identifiés soit par des études de clonage et séquençage, soit par des approches informatiques utilisant des programmes de prédiction basés sur la conservation des miARNs entre les différentes espèces et sur la détection de structures typiques, en épingle à cheveux, des précurseurs des miARNs. Tous les miARNs sont répertoriés dans une base de données appelée miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/> (Griffiths-Jones *et al.*, 2008)). La version 19 de miRBase (mise à jour en Août 2012) répertorie actuellement 25 141 miARNs matures dans 193 espèces, dont 2 197 chez l'Homme.

La nomenclature des miARNs est la suivante :

- Les miARNs matures sont notés miR-X, X correspondant à une valeur numérique attribuée généralement par ordre de mise en évidence.

- Un code à 3 lettres est ajouté comme préfixe pour préciser l'organisme dont ils sont originaires. La première lettre correspond au genre de l'organisme et les deux autres à l'espèce.

Par exemple, hsa pour *Homo sapiens* ou mmu pour *Mus musculus*.

- Quand la séquence des miARNs matures diffère de quelques bases, une lettre est ajoutée comme suffixe. Les miARNs appartiennent alors à la même famille. La partie 5' du miARN est généralement identique entre les membres de la même famille.

Par exemple : La famille des miR-181 : miR-181a, miR-181b et miR-181c:

- miR-181a : 5'-aacauuca**acg**cugucggug**a**gu-3'
- miR-181b : 5'-aacauuca**uug**cugucggug**g**gu-3'
- miR-181c : 5'-aacauuca**ac**_cugucggug**a**gu-3'

○ Quand les deux brins du pré-miARN donnent naissance à des miARNs matures, une indication est donnée pour spécifier quel bras de la structure en épingle à cheveux du pré-miR génère l'un ou l'autre des deux miARNs.

Plusieurs nomenclatures peuvent être utilisées :

- miR-X et miR-X*: miR-X* étant le miARN le moins abondant des deux dans la cellule.
- miR-X-5p et miR-X-3p: 5p et 3p correspondant aux brins contenant les extrémités 5' ou 3' de la structure en épingle à cheveux du pré-miARN. Cette nomenclature est actuellement la nouvelle nomenclature utilisée par miRBase.
- miR-X-s (bras 5') et miR-X-as (bras 3'). -s et -as correspondant respectivement à sens et anti-sens.

○ Enfin, un miARN mature peut résulter de la transcription et la maturation de transcrits de loci génomiques différents. Un suffixe numérique est alors ajouté aux noms de des miARNs.

Par exemple : miR-181a-1 et miR-181a-2 (le gène *miR-181a-1* étant sur le chromosome 1 et *miR-181a-2* sur le chromosome 9).

Néanmoins, certains miARNs tels que hsa-let-7 et cel-lin-4, ne suivent pas cette nomenclature et conservent leur nom historique donné lors de leur découverte.

3. Mécanisme d'action et fonction des miARNs

a- Reconnaissance de la cible

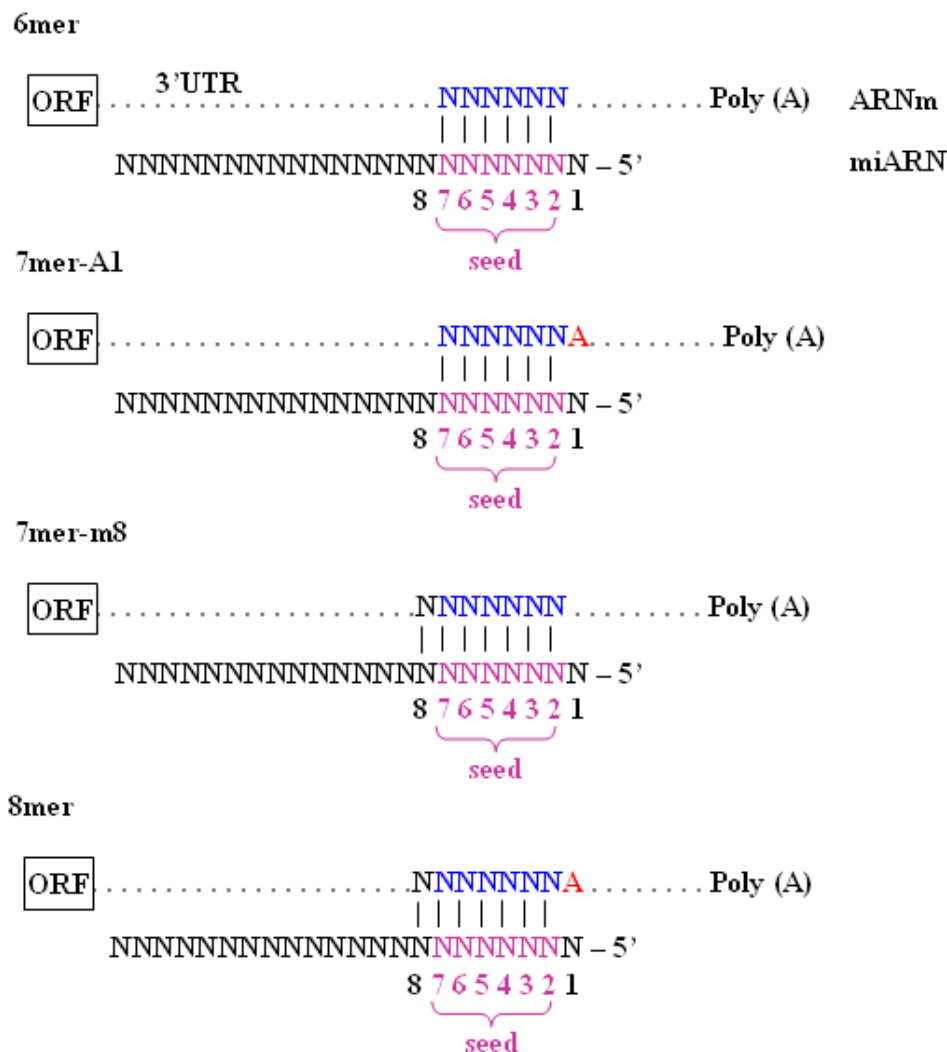
- **Liaison miARN – ARNm**

Les miARNs se lient par complémentarité de séquences, sur un élément de reconnaissance du miARN (MRE), situé sur l'ARNm cible.

L'appariement des nucléotides 2-7 (séquence seed) de l'extrémité 5' du miARN est crucial pour la spécificité de sélection de la cible (**Figure 12**). Ce concept a d'abord été introduit par des prédictions informatiques, indiquant que la région seed a le plus grand nombre de sites cibles conservés par rapport à la séquence entière du miARN (Lewis *et al.*, 2003). Peu de temps après, des études à large échelle ont montré qu'une dérégulation de l'expression de miARNs entraînait une dérégulation de l'expression de gènes enrichis en séquence complémentaire de la région seed (Baek *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2005; Selbach *et al.*, 2008). D'autres découvertes biochimiques et structurales ont permis de mieux comprendre la liaison miARN-ARNm au niveau de la région seed. Dans le complexe RISC, la région seed contribue de façon disproportionnée à l'énergie requise pour la liaison à la cible (Ameres *et al.*, 2007; Haley and Zamore, 2004). De plus, cette région est organisée en conformation hélicoïdale dans la protéine Ago, de façon à ce que les bases soient positionnées pour la liaison à l'ARN cible (Schirle and MacRae, 2012; Wang *et al.*, 2008b).

Le nucléotide qui suit immédiatement la séquence complémentaire à la séquence seed dans le MRE de l'ARNm cible est souvent un A, capable de s'hybrider avec le premier nucléotide de beaucoup de miARNs qui commencent par un U (Lewis *et al.*, 2005). Cependant, la conservation du A en face de la position 1 du miARN est également observée dans les MRE pour des miARNs qui ne commencent pas par U (Lewis *et al.*, 2005) (**Figure 12**). Il a même été montré que pour les miARNs ne commençant pas par U, les MRE avec un A en face de la position 1 du miARN sont plus efficaces que ceux avec un nucléotide complémentaire en face de ce nucléotide (Baek *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2007).

Ces observations suggèrent que la séquence seed est importante pour l'interaction miARN-ARNm cible et que le mésappariement du nucléotide 1 du miARN est toléré et peut même être positif. Il existe donc plusieurs catégories de sites potentiels MRE sur la 3'UTR



complémentarité substantielle a lieu dans la région 3' du miARN (Reinhart *et al.*, 2000). D'autres sites validés expérimentalement n'obéissent pas à la règle de la séquence seed ou n'ont pas de schéma de complémentarité suffisamment spécifique pour être généralisé en type de site défini (Johnson *et al.*, 2005; Lal *et al.*, 2009; Tay *et al.*, 2008). Une recherche de motifs enrichis dans les sites orphelins a tout de même identifié une nouvelle classe de MRE, les sites bombés (bulged sites) (Chi *et al.*, 2012). Ces sites ont une complémentarité de séquence parfaite avec la région seed du miARN, sauf qu'un nucléotide du MRE doit être mis à l'écart (**Figure 13**).

Site bombé

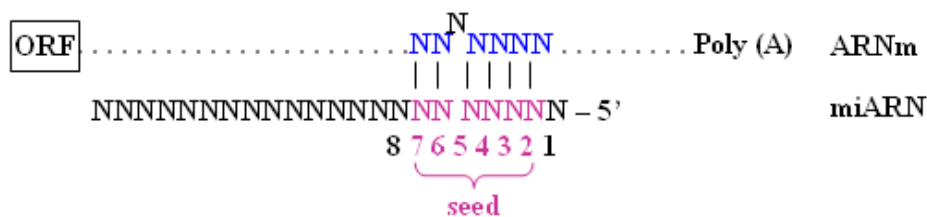


Figure 13 : Site cible de miARN bombé.

Le site cible bombé correspond à un site 6mer, sauf qu'un nucléotide de l'ARNm cible doit être mis à l'écart.

Les membres d'une famille de miARNs ont la même séquence seed et par conséquent les mêmes cibles potentiels.

- **Localisation de l'interaction miARN - ARNm**

La plupart des MRE identifiés résident dans la 3'UTR des ARNm cibles. Ce biais de position peut dépendre du fait que la recherche des MRE ait été réalisée dans la 3'UTR, après la découverte des premiers gènes cibles de miARNs et du fait de la prédiction de sites *in silico*. Cependant, cette localisation préférentielle peut aussi avoir une base fonctionnelle, empêchant peut être que la liaison du miRISC soit déplacée ou gênée par la machinerie traductionnelle (Bartel, 2009). En effet, la partie codante d'un ARNm activement traduit est couvert de ribosomes.

Plus de 45 000 sites complémentaires à la région seed de miARNs sont particulièrement conservés dans la 3'UTR d'ARNm cibles, suggérant une fonction régulatrice prédominante dans cette région (Friedman *et al.*, 2009). Dans certains cas, les miARNs peuvent aussi cibler la 5'UTR (Lytle *et al.*, 2007) ou la région codante (ORF) (Tay *et al.*, 2008) des ARNm cibles.

- **Outils informatiques pour la recherche de cibles de miARNs**

Il existe actuellement de nombreuses ressources informatiques permettant de rechercher les ARNm cibles des miARNs (Vlachos and Hatzigeorgiou, 2013). Ces ressources sont divisées en deux catégories, les algorithmes de prédiction des ARNm cibles et les bases de données de cibles de miARNs validées expérimentalement. Elles sont présentées **Figure 14**.

Prédiction de cibles de miARNs	
Nom	Site internet
TargetScan	http://www.targetscan.org
DIANA-microT-CDS	http://www.microna.gr/microT-CDS
microRNA.org	http://microna.org
miRDB	http://www.mirdb.org
RNA22	http://cm.jefferson.edu/rna22v1.0-homo_sapiens
TargetMiner	http://www.isical.ac.in/~bioinfo_miu/targetminer20.htm
PicTar	http://www.pictar.mdc-berlin.de

Bases de données de cibles de miARNs validées expérimentalement	
Nom	Site internet
DIANA-Tarbase	http://www.microna.gr/tarbase
miRTarBase	http://www.mirtarbase.mcb.nctu.edu.tw
miRecords	http://www.mirecords.biolead.org

Figure 14 : Outils informatiques pour la recherche de cibles de miARNs.

Les outils sont séparés en deux catégories, les outils de prédiction de cibles de miARNs et les bases de données de cibles de miARNs validées expérimentalement.

Les algorithmes de prédiction prennent en compte la complémentarité de la région seed, qui est considérée comme très importante, mais également la conservation des MRE, la localisation de l'interaction miARN-ARNm, la stabilité de la liaison et l'accès aux MRE (Alexiou *et al.*, 2009). Ces méthodes sont efficaces pour identifier les gènes cibles potentiels des miARNs et sélectionner des candidats prometteurs pour des expériences de validation

biologique. Cependant, la sensibilité et la spécificité sont d'environ 60% et 30%, respectivement (Vlachos and Hatzigeorgiou, 2013). Les 3 algorithmes les plus utilisés sont TargetScan, DIANA-microT-CDS et microRNA.org. Actuellement, le meilleur pari pour identifier de nouveaux gènes cibles de miARNs est l'utilisation combinée d'algorithmes de prédiction et de techniques expérimentales à haut débit, comme par exemple, les puces pangénomiques ou le séquençage d'ARN (RNAseq).

En ce qui concerne les bases de données de cibles validées expérimentalement, les données ont été récoltées à partir d'études transcriptomiques ou protéomiques, après dérégulation de l'expression du miARN, et à partir d'études (*in vitro*) basées sur l'interaction miARN-3'UTR.

b- Régulation de l'expression des gènes cibles par les miARNs

Le mécanisme de régulation des gènes cibles par les miARNs n'est pas encore pleinement identifié (Chekulaeva and Filipowicz, 2009; Fabian *et al.*, 2010a; Fabian *et al.*, 2010b).

Des constatations préliminaires sur les mécanismes de répression par les miARNs viennent des études sur *lin-4*, qui démontrent que *lin-4* réprime la traduction de l'ARNm *lin-14* avec peu ou pas d'effet sur son abondance (Olsen and Ambros, 1999). Cette étude suggère alors que les miARNs répriment la traduction de leurs gènes cibles, sans influencer les taux d'ARNm. Par ailleurs, de nombreuses études suggèrent que les miARNs peuvent inhiber la traduction durant l'initiation (Mathonnet *et al.*, 2007; Pillai *et al.*, 2005; Thermann and Hentze, 2007; Wang *et al.*, 2006), ou après l'étape d'initiation (Maroney *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2006) (**Figure 15**). Lors de l'initiation de la traduction, les miARNs peuvent interagir avec la fonction ou le recrutement du facteur d'initiation eIF4E, à la coiffe 5' de l'ARNm, ou empêcher la liaison entre les sous-unités 60S et 40S des ribosomes (Chendrimada *et al.*, 2007), inhibant ainsi la traduction de l'ARNm ciblé. Si l'initiation de la traduction se passe correctement, les miARNs peuvent dégrader la protéine naissante (Nottrott *et al.*, 2006) ou dissocier prématurément les ribosomes (Petersen *et al.*, 2006).

Cependant, des études transcriptomiques ont montré que l'abondance des ARNm cibles peut être inversement corrélée avec le niveau de miARNs (Lewis *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2005). Plusieurs études ont ensuite indiqué que la dégradation des ARNm est un composant

important de la répression par les miARNs, par déadénylation de l'ARNm (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2009; Rehwinkel *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006) (**Figure 15**). Ces études, basées sur le rôle de miARNs individuels sur certains ARNm cibles, n'ont pas évalué les effets globaux des miARNs sur la répression de la traduction des ARNm et leur stabilité.

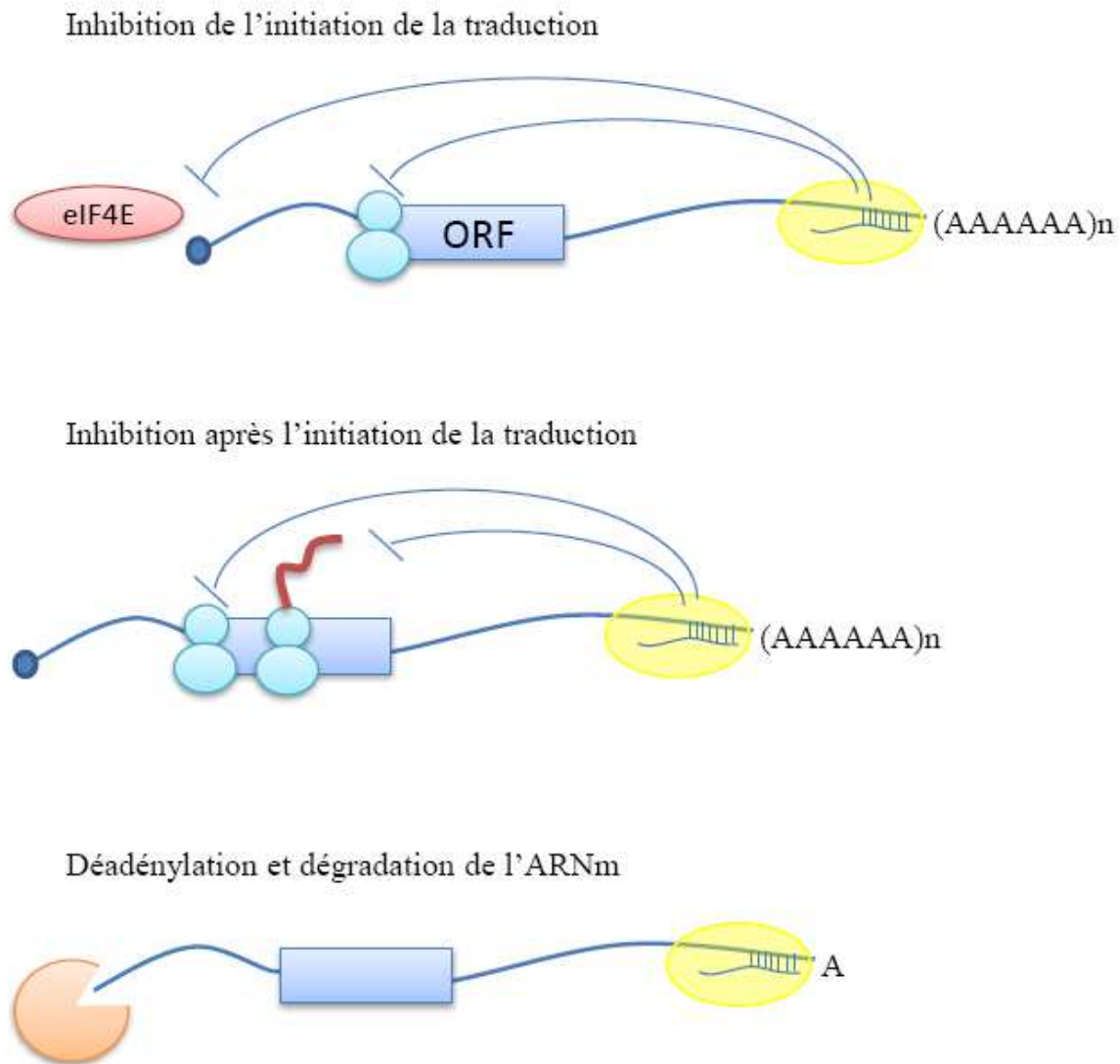


Figure 15 : Mécanismes de régulation de l'expression des gènes cibles par les miARNs.

Les miARNs peuvent réprimer l'expression de leurs gènes cibles par des mécanismes post-transcriptionnels. Parmi les mécanismes identifiés, les miARNs peuvent agir au niveau de l'initiation de la traduction ou lors des étapes suivantes, en agissant sur le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, sur les ribosomes ou en dégradant la protéine naissante. Les miARNs peuvent également induire la dégradation de l'ARNm par déadénylation. Figure modifiée à partir de Filipowicz *et al* et Ul Hussain (Filipowicz *et al.*, 2008; Ul Hussain, 2012).

L'étude de la contribution relative de la répression de la traduction et de la dégradation de l'ARNm suggère que la majorité de la répression est due à une dégradation de l'ARNm, bien qu'une petite partie des cibles soient réprimées au niveau traductionnel uniquement (Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008). D'autres études ont apporté des preuves mécanistiques sur la répression par les miARNs. Par exemple, l'analyse du profil des polysomes, pour rechercher les effets du miARN sur l'occupation et la densité de ribosomes sur les ARNm cibles, a révélé que la dégradation des ARNm représente environ 75% de la diminution de l'expression protéique (Hendrickson *et al.*, 2009). Des études plus récentes, utilisant le profil des ribosomes pour évaluer l'efficacité traductionnelle, ont démontré qu'environ 84% de la réduction de la production de protéines est attribuable à la dégradation de l'ARNm (Guo *et al.*, 2010).

Bien que ces études indiquent que la dégradation de l'ARNm apporte une contribution majeure à la fonction de répression des miARNs, elles n'ont pas clairement défini le déclenchement initial de la répression. Une dégradation initiale de l'ARNm entraînerait, sans aucun doute, la répression traductionnelle mais il se peut également que la répression de la traduction précède ce phénomène (Bazzini *et al.*, 2012). Bazzini *et al* ont montré que parmi les ARNm cibles de miR-430, certains ont uniquement leur traduction réprimée, d'autres sont purement dégradés et les derniers ont une traduction réprimée, suivie d'une dégradation de l'ARNm.

Le fait que la réduction du taux de protéine dépende purement de l'inhibition de la traduction, de la dégradation de l'ARNm ou des deux, reste donc encore à débattre.

Les miARNs ne sont pas seulement connus pour réprimer la traduction. Certains miARNs ont été rapportés comme pouvant activer la traduction sous certaines conditions (Orom *et al.*, 2008; Vasudevan *et al.*, 2007). Par exemple, des miARNs qui réprimaient la traduction dans les cellules en prolifération, sont capables de l'activer dans les cellules quiescentes arrêtées en G0/G1 (Vasudevan *et al.*, 2007). De plus, bien que les mécanismes ne soient pas encore connus, miR-122 active la traduction en se liant à la 5'UTR d'une de ces cibles, alors qu'il réprime la traduction d'autres cibles dont le MRE est situé dans la 3'UTR (Jopling *et al.*, 2008).

c- Fonction biologique des miARNs

Les miARNs, qui sont fortement conservés durant l'évolution, ont été montrés comme étant des régulateurs post-transcriptionnels de beaucoup de processus biologiques fondamentaux, tels que l'embryogenèse, le métabolisme, la prolifération, le vieillissement, la mort cellulaire et bien d'autres encore (Huang *et al.*, 2013).

Avec plus de la moitié des ARNm qui sont des cibles conservées des miARNs (Friedman *et al.*, 2009), il s'avère difficile de trouver une fonction biologique ou un processus qui ne soit pas influencé au moins en partie, dans certaines cellules, par les miARNs.

Les miARNs sont maintenant devenus le centre d'intérêt de nombreuses recherches concernant de nombreuses pathologies, dont les pathologies cancéreuses, comme le montre la croissance exponentielle des publications dans les 10 dernières années (Huang *et al.*, 2013). Toutes ces études montrent que les miARNs peuvent jouer un rôle dans de nombreuses maladies, aussi variées que l'arthrite, les troubles neurodégénératifs, les maladies cardiovasculaires...

Le profil d'expression des miARNs peut alors être utilisé comme nouveau biomarqueur, offrant potentiellement des tests plus sensibles et plus spécifiques que ceux actuellement utilisés pour le diagnostic de cancers (Kim and Reitmaier, 2013) ou de certaines maladies, comme par exemple l'insuffisance cardiaque (Schmitter *et al.*, 2013) ou la maladie d'Alzheimer (Jin *et al.*, 2013).

4. Régulation de l'expression des microARNs

a- Régulation au niveau transcriptionnel

L'expression des miARNs a été décrite comme étant spécifique du tissu et du stade développemental, liée à l'expression des facteurs de transcription (Neilson *et al.*, 2007; Obernosterer *et al.*, 2006). La plupart des gènes miR sont transcrits par l'ARN polymérase II (Lee *et al.*, 2004) et ce processus est donc régulé par un arsenal de facteurs de transcriptions (TF), en plus des facteurs généraux de la transcription, présent dans les cellules (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004).

De nombreux éléments régulateurs ont été identifiés en amont des gènes miR et semblent être essentiels à la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des miARNs (Lee *et al.*, 2007). Ils sont préférentiellement localisés dans les 1000 bases en amont de la séquence du pré-miARN et 99% de motifs les plus prédits se trouvent dans les 500 nucléotides en amont du site de début de transcription (TSS) (Lee *et al.*, 2007).

Afin de prédire les sites de liaison des TF, de nombreuses données de ChIP-Seq sur c-Myc, Max, c-Fos, c-Jun, E2F1, STAT1, NF-kappa-B, et presque 60 autres TF dans 27 lignées cellulaires peuvent être obtenues à partir de UCSC Genome Browser.

Environ 70 régions promotrices de gènes miR, étant régulées par au moins un TF, ont été identifiées (Wang *et al.*, 2013). Les TF interagissent avec les motifs de cis-régulation présents en amont du TSS, pour activer ou réprimer l'expression de gènes miR. Parmi les divers TF, on trouve les récepteurs nucléaires, tels que le récepteur aux œstrogènes ou AR. AR est en effet capable d'activer la transcription de gènes miR (Fletcher *et al.*, 2012) ou de la réprimer (Sun *et al.*, 2013).

Les régulations épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN et les modifications d'histones, peuvent également réguler l'expression des miARNs au niveau transcriptionnel (Wang *et al.*, 2013).

b- Régulation au niveau post-transcriptionnel

En plus d'une régulation transcriptionnelle, les étapes impliquées dans la biogenèse et la maturation des miARNs peuvent également être soumises à régulation.

Drosha et Dicer, les deux enzymes clés de la biogenèse des miARNs, nécessitent la présence d'autres protéines pour réaliser leurs fonctions, dont les partenaires de liaison à l'ARN double brin, tels que DGCR8 pour Drosha et TRBP pour Dicer. Les taux et l'activité de ces deux protéines sont sujets à régulation, ce qui affecte l'accumulation des miARNs. Par exemple, DGCR8 a un effet stabilisant sur Drosha, tandis que Drosha régule DGCR8 en clivant des structures tige-boucles présentes dans l'ARNm de DGCR8, induisant sa dégradation (Han *et al.*, 2009; Triboulet *et al.*, 2009). De même, une diminution de TRBP entraîne une déstabilisation de Dicer et un défaut dans le clivage du pri-miARN (Chendrimada *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2009). D'autres mécanismes peuvent également participer à la régulation de l'activité de Dicer et Drosha, comme par exemple une régulation

de leur expression par les miARNs, formant une boucle de rétrocontrôle négative (Forman *et al.*, 2008).

Des études récentes ont identifié une batterie de protéines, comme par exemple p68, p72, p53, SMAD, SNIP1, ARS2, NF90, NF45..., capables de réguler ces deux étapes de maturation des miARNs (positivement ou négativement), en interagissant avec Drosha ou Dicer ou en se liant aux précurseurs des miARNs (Krol *et al.*, 2010; Winter *et al.*, 2009). Bien que ces régulateurs s'adressent à des familles particulières de miARNs, la plupart affectent la biogenèse d'un large éventail de précurseurs de miARNs, suggérant que leur activité peut modifier l'expression d'un réseau entier de gènes.

Les hélicases p68 et p72, identifiées comme composantes du complexe Drosha, peuvent stimuler le clivage d'un tiers des pri-miARNs murins (Fukuda *et al.*, 2007). Elles interagissent avec une gamme de protéines, certainement en recrutant des facteurs pour le complexe Drosha, pour permettre le clivage du pri-miARN. Par exemple, p68 permet l'interaction de p53 avec le complexe Drosha, activant le clivage des pri-miR-16-1, -143 et -145 en réponse aux dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses (Suzuki *et al.*, 2009). p68 peut aussi interagir avec les SMADs, transducteurs de signal des voies TGF β et BMP pour la maturation du pri-miR-21 (Davis *et al.*, 2008). Les récepteurs nucléaires d'hormones peuvent également agir à ce niveau de régulation comme le récepteur aux œstrogènes α (ER α) qui, sous liaison aux œstrogènes, interagit avec p68, p72 et Drosha pour réprimer le clivage de quelques pri-miARNs (Watanabe *et al.*, 2001; Yamagata *et al.*, 2009).

IV. miARNs et cancer de la prostate

Les miARNs jouent un rôle clef dans la régulation de nombreux processus cellulaires, dont le développement, la prolifération cellulaire, l'apoptose... et des profils d'expression aberrants de miARNs ont été identifiés dans de nombreux cancers humains, ces dernières années.

Volinia *et al* (Volinia *et al.*, 2006) ont été les premiers à identifier une signature d'expression des miARNs dans les tumeurs solides humaines, dont le CaP. De nombreuses études sur l'expression différentielle des miARNs entre différents échantillons de patients, différentes lignées cellulaires et différents traitements ont ensuite été réalisées. Une grande avancée sur l'étude fonctionnelle des miARNs a eu lieu ces dernières années, permettant de mieux comprendre leur rôle dans la tumorigenèse et la progression du CaP. Cependant, tous les mécanismes moléculaires mis en jeu sont loin d'avoir été identifiés et des données contradictoires existent, ce qui suggère que ce sujet de recherche nécessite encore d'être approfondi.

1. miARNs comme biomarqueurs potentiels du CaP

a- Signature d'expression des miARNs dans le tissu tumoral

- **miARNs comme marqueurs potentiels du CaP**

Plusieurs études ont essayé d'identifier le profil d'expression des miARNs dans le CaP par rapport au tissu sain ou à de l'HBP et les résultats obtenus sont répertoriés dans le **Tableau 1**. Un miARN dont l'expression est augmentée dans une étude peut se retrouver sous-exprimé dans une autre (noté en gris dans le **Tableau 1**). Cependant, l'expression de certains miARNs est identique dans la majorité des études (au minimum 5 études sur les 10) ; ils sont notés en bleu dans le **Tableau 1**. Bien qu'aucun consensus ne puisse être établi, cette figure fait ressortir une signature moléculaire dans la tumeur composée de la sous-expression de **miR-125b**, **-145**, **-205**, **-221** et **-222** (dont miR-145 sous-exprimé dans 8 études sur 9 et miR-221 dans 7 études sur 9), ainsi que la surexpression de **miR-25**, **miR-182** et **miR-375**.

INTRODUCTION

Les résultats discordants observés semblent être la conséquence de la variabilité des facteurs expérimentaux, à savoir la diversité des techniques employées (hybridation sur puces, hybridation sur billes, séquençage à haut débit) au cours de ces études et le type d'échantillons sur lequel porte l'étude. Les échantillons tumoraux n'appartiennent que rarement au même stade de développement du cancer de la prostate et l'échantillon de référence est, selon les études, soit du tissu normal de patients sains, soit du tissu normal avoisinant la tumeur, soit de l'HBP. De plus, l'utilisation des ARN totaux contenant les précurseurs de miARNs dans certaines études peut générer des hybridations croisées avec les sondes spécifiques des miARNs matures (Ozen *et al.*, 2008).

	miARNs surexprimés	miARNs sous-exprimés
(Volinia <i>et al.</i> , 2006)	let-7d, -7i, miR-16-1, -17-5p, -20a, -21, -25, -26a-1, -27a, -29a, -29b-2, -30c, -32, -34a, -92-2, -93-1, -95, -101-1 préc., -106a, -124a-1, -135-2, -146, -148, -181b-1, -181b-1 préc., -184 préc., -187, -191, -195, -196-1, -196-1 préc., -197, -198, -199a-1, -199a-2, -203, -206, -214, -223	let-7a-2 préc., miR-24-1, -29a préc., -128-a préc., -149, -218-2
(Porkka <i>et al.</i> , 2007)	miR-184, -198, -202, -210, -296, -302c, -320, -345, -370, -373*, -491, -498, -503, -513	let-7a-d, -7f-g, miR-16, -19b, -22, -23a, -23b, -26a-b, -27a-b, -29a-b, 30a-c, -92, -99a, -100, -103, -125a-b, -141, -143, -145, -148, -195, -199a, -199a*, -205, -221, -222, -497
(Ozen <i>et al.</i> , 2008)		let-7(b-g et i), miR-16, -21, -23b, -26a-b, -29a-c, -30a-e, -34a, -99a-b, -100, -125a-b, -145, -200a-b, -205, -221, -222
(Ambs <i>et al.</i> , 2008)	let-7i, miR-25, -26a-1/2, -31, -32, -34b, -92-1/2, -93, -99b, -106b, -125a, -181a-1/2, -182, -188, -194-1/2, -196a-1/2, -200c, -370, -375, -425, -449	let-7b, miR-1-2, -7-1/2, -34a, -126, -128a, -133a-1, -145, -205, -206, -218-2, -220, -221, -329, -340, -345, -410, -487, -490, -494, -499, -520h
(Tong <i>et al.</i> , 2009)	let-7a, miR-20a, -25, -122a, -129, -135b, -141, -194, -302	miR-23b, -24, -100, -125b, -143, -145, -205, -221, -222
(Schaefer <i>et al.</i> , 2009)	miR-96, -182, -182*, -183, -375	miR-16, -31, -125b, -145, -149, -181b, -184, -205, -221, -222
(Navon <i>et al.</i> , 2009)	miR-7, -17*, -29c, -30a, -30a*, -96, -154*, -182, -183, -203, -520g, -629*, -663	miR-1, -10b, -21*, -23b*, -92a-1*, -100, -126, -133b, -139-5p, -143*, -144*, -145, -145*, -195, -196a, -451, -486-5p, -497, -550*
(Szczyrb a <i>et al.</i> , 2010)	let-7a, c, f, miR-15b, -20a, -21, -25, -26b, -30b, -106a, -106b, -126*, -148a, -200c, -218, -375	miR-22, -24, -27a, -27b, -29a, -30e, -101, -125a-5p, -125b, -143, -145, -152, -199a-5p, -221, -223, -320, -424
(Martens-Uzunova <i>et al.</i> , 2012)	miR-7, -21, -25, -32, -93, -95, -96, -106b, -130b, -142-3p, 148a, -153, -182, -182*, -183, -183*, -301b, -375, -425, -583, -615-3p, -663, -801	miR-1, -10b*, -34b, -133a, -133b, -143*, -145, -145*, -149, -193b, -193b*, -204, -205, -221, -221*, -222, -224, -328, -338-3p, -378, -378*, -455-3p, -455-5p, -483-3p, -485-3p
(Wach <i>et al.</i> , 2012)	let-7a, miR-17, -20a, -20b, -21, -93, -101, -106a, -106b, -141, -182, -200b, -200c, -375, -720, -768-3p, -1274b, -1826	miR-136*, -145, -214, -221, -222, -302d*, -378

Tableau 1 : miARNs dérégulés dans le CaP par rapport au tissu sain ou à l'HBP.

Les miARNs retrouvés dans la majorité des études sont notés **en bleu** ; les miARNs présentant un comportement différent selon les études sont notés **en gris** ; préc. : Précurseur

Ces résultats provenant généralement d'études à haut débit, il est important de les valider en essai individuel. Des études plus ciblées ont alors identifié des nouveaux miARNs ou validé ceux obtenus précédemment (**Figure 16**). On observe cependant un désaccord sur l'expression de miR-221 et miR-222 qui sont soit surexprimés, soit sous-exprimés selon les études.



Tissus tumoraux / tissus sains ou HBP					
					
miR-20a	miR-375	let-7c	miR-34c	miR-205	
miR-22	miR-616	let-7d	miR-124	miR-221	
miR-25		miR-1	miR-125b	miR-222	
miR-30d		miR-15a	miR-130a	miR-224	
miR-96		miR-16-1	miR-132	miR-320	
miR-106b		miR-23b	miR-133a	miR-373	
miR-141		miR-26a	miR-141	miR-449	
miR-182		miR-26b	miR-143	miR-520c	
miR-183		miR-29a	miR-145	miR-1256	
miR-204		miR-31	miR-152		
miR-221		miR-34a	miR-187		
miR-222		miR-34b	miR-203		

Figure 16 : miARNs dérégulés entre le tissu prostatique tumoral et soit le tissu prostatique normal de patients atteints de CaP, soit de l'HBP.

Les dérégulations de l'expression des miARNs ont été validées par des tests individuels dans les tissus prostatiques tumoraux par rapport aux tissus sains ou d'HBP. Les références pour les miARNs sous exprimés sont les suivantes : (Boll *et al.*, 2013; Bonci *et al.*, 2008; Formosa *et al.*, 2013; Fuse *et al.*, 2012; Hagman *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2013; Koh *et al.*, 2011; Kojima *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012c; Majid *et al.*, 2013; Majid *et al.*, 2010; Mavridis *et al.*, 2013; Noonan *et al.*, 2009; Ozen *et al.*, 2008; Ramberg *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2012; Szczyrba *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2009; Viticchie *et al.*, 2011; Yamamura *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2009; Zaman *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013). Les références pour les miARNs surexprimés sont les suivantes : (Kobayashi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012b; Ma *et al.*, 2011; Mercatelli *et al.*, 2008; Mihelich *et al.*, 2011; Polisenio *et al.*, 2010; Szczyrba *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2011; Wach *et al.*, 2012).

La mise en évidence d'une dérégulation d'expression des miARNs entre les tissus sains de patients sans tumeur et les tissus sains avoisinants de patients atteints de CaP, avec ou non un taux élevé de PSA, a contribué à l'identification de miARNs pouvant potentiellement être impliqués dans la tumorigenèse prostatique. Hellwinkel *et al* (Hellwinkel *et al.*, 2013) ont identifié sept miARNs sous-exprimés dans les tissus sains de patients atteints de CaP (let-7a, let-7b, miR-16, miR-124a, miR-146a, miR-146b et miR-185). De plus, en comparant

uniquement les tissus prostatiques sains de patients, atteints ou non de CaP, ayant un taux élevé de PSA, seule la diminution de **let-7a**, **let-7b**, **miR-16** et **miR-185** reste significative. L'expression de ces quatre miARNs pourrait alors être utilisée comme marqueur additionnel de diagnostic dans les biopsies de patients avec des taux élevés de PSA sérique, permettant ainsi de réduire le taux de faux négatifs (**Figure 16**).

- **miARNs comme marqueurs potentiels de la progression du CaP**

Pour obtenir un profil d'expression en miARNs associée à la progression du CaP, des analyses comparatives entre les tissus prostatiques tumoraux primaires ou secondaires de CaP localisés dans l'organe, localement avancés, métastatiques ou de CRPC ont été réalisées.

- miARNs associés aux caractéristiques de la tumeur

Ambs *et al* (Ambs *et al.*, 2008) ont été les premiers à rechercher un profil miARN caractéristique de l'extension extra-prostatique, facteur de mauvais pronostic. Ils ont alors observé un différentiel d'expression des miARNs entre les tumeurs présentant une extension extra-prostatique (stade pT3) et les tumeurs localisées, dont la surexpression de **let-7f-2**, **miR-30c-1/2**, **-34c**, **-99b**, **-101-1/2**, **-186**, **-195**, **-196a-1/2**, **-200a-b** et **-484** et la sous-expression de **miR-371**, **-373**, **-410** et **-491**.

D'autres études ont cherché à corréler l'expression de certains miARNs avec des paramètres d'agressivité du CaP. Ainsi, l'expression de **miR-152** diminue dans les tumeurs dont le score de Gleason est supérieur à 7 et dont le stade pathologique est avancé (Zhu *et al.*, 2013).

Des résultats controversés sur **miR-221** indiquent soit une augmentation de l'expression de ce miARN (ainsi que de **miR-222**) (Lin *et al.*, 2011), soit une diminution dans les échantillons de cancer agressif, selon leur grade de Gleason (Spahn *et al.*, 2010).

En séparant les échantillons tumoraux par microdissection en fonction du grade de Gleason, Tsuchiyama *et al* ont rapporté que, pour un même grade de Gleason (grade 4), l'expression de **miR-31**, **miR-182** et **miR-205** est significativement plus élevée dans les cancers plus évolués (Tsuchiyama *et al.*, 2012).

- miARNs associés aux métastases

D'autres études se sont intéressées à l'expression des miARNs dans les CaP métastatiques régionaux (ganglions lymphatiques) ou distants.

Il a été rapporté une diminution globale de l'expression des miARNs dans les métastases de ganglions lymphatiques par rapport aux CaP confinés dans l'organe (dont **miR-1**, **-133a**, **-133b**, **-143**, **-143***, **-145**, **-145***, **-204**, **-221** et **-222**). Ces miARNs étaient sous-exprimés dans les CaP par rapport aux tissus sains (Martens-Uzunova *et al.*, 2012).

L'expression de **miR-205** est également associée à l'envahissement des ganglions lymphatiques, puisqu'elle diminue dans les tumeurs primaires de patients avec CaP étendu aux ganglions lymphatiques par rapport aux CaP sans atteinte régionale des ganglions (Gandellini *et al.*, 2009).

Basé sur l'analyse des profils d'expression de miARNs entre des CaP primaires et des métastases osseuses, **miR-143** et **miR-145**, qui sont sous-exprimés dans les métastases, semblent spécifiquement impliqués dans le développement des métastases osseuses (Peng *et al.*, 2011). De plus, l'expression de ces deux miARNs est négativement corrélée au score de Gleason.

- miARNs associés aux CRPC

Les premières études cherchant à identifier les miARNs impliqués dans la progression tumorale prostatique vers une forme résistante à la castration ont été réalisées en comparant le profil en miARNs de lignées cellulaires prostatiques androgéno-dépendantes (AD) et androgéno-indépendantes (AI) *in vitro*, ou de xénogreffes de ces mêmes lignées *in vivo* chez la souris (**Tableau 2**). Les lignées AD expriment AR, PSA et peuvent répondre à une stimulation androgénique. Les lignées AI sont soit des lignées AD rendues résistantes à une privation androgénique, soit des lignées qui proviennent de tumeurs avancées ayant perdu leurs activités phosphatases acides et/ou de DHT-5 α -réductase et/ou n'exprimant plus AR et PSA.

Ma *et al.*, ont confirmé, par une analyse individuelle, les résultats obtenus (présentés dans le Tableau 2) pour **miR-135a**, **miR-222**, **miR-331**, **miR-365**, **miR-455**, **miR-616** et **miR-671**, mais pas pour miR-181c et miR-587 (Ma *et al.*, 2011).

	miARNs surexprimés	miARNs sous-exprimés
(Lin <i>et al.</i> , 2008)	miR-184, -361, -424	miR-19b, -29b, 128b, -146a, -146b, -221, -222, -663
(Shi <i>et al.</i> , 2007)	miR-16, -21, -30c, -100, -125b	miR-92, -106a
(Sun <i>et al.</i> , 2009)	miR-15a, -16, -221, -222	miR-23b, -27b, -203
(Xu <i>et al.</i> , 2010)	let-7a*, let-7d*, let-7i, miR-1, -7, -10b, -27a, -27b, -30a, -30a*, -30c, -30c-2*, -100, -124, -125b-2*, -143, -146b-5p, -148b, -183*, -199a-3p, -199b-3p, -221, -221*, -222, -296-3p, -320a, -320b, -320c, -320d, -374b, -423-5p, -486-5p, -629, -744, -760, -877, -1259, -1272, -1301, -1308, -1323	miR-9*, -15b, -16, -17, -19b, -20a, -21, -22, -22*, -28-5p, -29a, -29b, -93, -96, -96*, -106a, -106b, -141, -193a-3p, -195, -200a, -200b -200b*, -200c, -301a, -301b, -324-5p, -331-3p, -362-5p, -375, -424, -425, -429, -452, -497, -532-3p, -532-5p, -589*, -664, -940, -1277, -1975
(Ma <i>et al.</i> , 2011)	miR-222, -231, -331, -455, -520h, -542-5p, -569, -616, -671, -801	miR-135a, -181c, -365, -374, -587

Tableau 2 : miARNs dérégulés dans les lignées AI par rapport aux lignées AD.

Les miARNs retrouvés dans au moins deux études sont notés **en bleu** ; les miARNs présentant un comportement différent selon les études sont notés **en gris** ;

A partir de ces résultats, Sun *et al* ont ensuite comparé l'expression de ces miARNs dans des tissus de prostate normale, d'individus atteints de CaP localisés non traités et d'individus atteints de CRPC (Sun *et al.*, 2012). Dans environ 90% des CRPC métastatiques étudiés on retrouve une augmentation de **miR-221/222** et une diminution de **miR-23b/-27b** (Sun *et al.*, 2012), la diminution étant confirmée par Ishteiwy *et al* (Ishteiwy *et al.*, 2012)

Deux autres études indépendantes, qui ont analysé l'expression de certains miARNs entre les CRPC et les CaP n'ayant pas subi de traitement, ont identifié une diminution de l'expression de **let-7c**, **miR-100** et **miR-218** (Leite *et al.*, 2011) et de l'expression de **miR-146a** (Xu *et al.*, 2012) dans les tumeurs CRPC.

Enfin, les miARNs **miR-141**, **miR-148** et **miR-32**, dont l'expression est augmentée par les androgènes, sont plus fortement exprimés dans les CRPC que dans les CaP ou dans les HBP (Jalava *et al.*, 2012; Waltering *et al.*, 2011).

Une étude *in silico*, basée sur des données provenant de TRANSFAC et miRBase, a identifié sept miARNs (miR-21, -135a, -135b, -144, -155, -448 et -654) potentiellement responsables du changement d'expression de centaines de gènes dans les CRPC et donc susceptibles d'être impliqués dans la progression vers une forme CRPC (Wang *et al.*, 2008a).

b- Valeur pronostique de l'expression des miARNs dans le CaP

L'expression des miARNs peut également être utilisée en terme de valeur pronostique afin de prédire l'évolution de la maladie. Pour cela, de nombreuses équipes ont analysé l'expression des miARNs dans la tumeur primaire de patients ayant ou non rechuté après prostatectomie. Bien que les paramètres choisis (en particulier ceux concernant la durée avant la rechute du CaP) soient différents entre les études, plusieurs miARNs ont été identifiés pour leur valeur pronostique.

Par exemple, une diminution d'expression de **miR-135b**, **miR-194**, **miR-200a**, **miR-647**, **miR-10b**, **miR-221**, **miR-145** et une augmentation d'expression de **miR-519**, **miR-96** sont associées à la rechute du CaP après prostatectomie (Barron *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2010; Fendler *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2011; Schaefer *et al.*, 2009; Spahn *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2009).

L'analyse de l'expression de ces différents miARNs sur les tissus prostatiques tumoraux au moment de la prostatectomie pourrait contribuer au choix d'une surveillance plus ou moins étroite, selon les patients. De plus, le dosage de ces miARNs pour le pronostic pourrait permettre de sélectionner les patients nécessitant une hormonothérapie précoce après prostatectomie.

c- miARNs circulants

Etant donné leur stabilité et leur disponibilité dans le sang périphérique, les miARNs circulants représentent peut-être la meilleure promesse de biomarqueurs de diagnostic et de pronostic et peuvent être aussi utilisés pour suivre la progression tumorale (Cortez *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2008). Entre 200 et 500 miARNs ont été détectés par RT-PCRq dans différents fluides biologiques humains comme le plasma, l'urine ou le lait maternel (Weber *et al.*, 2010). Le sang périphérique a été principalement utilisé pour analyser les miARNs libres chez les patients atteints de cancer (Cortez *et al.*, 2011).

Plusieurs études ont quantifié l'expression de miARNs dans le sérum ou le plasma sanguin de patients sains ou atteints de CaP. Les miARNs tissulaires dérégulés dans le CaP ont été souvent choisis pour l'analyse de leur expression dans le sérum. Mahn *et al.* (Mahn *et al.*, 2011) ont d'ailleurs remarqué, en analysant l'expression de cinq miARNs, que les taux de miARNs tissulaires était corrélé avec les taux de miARNs avant prostatectomie dans le sérum

et que les miARNs dans le sérum diminuaient après prostatectomie, indiquant donc une libération des miARNs associée à la tumeur.

Cette même étude a rapporté que l'expression de **miR-26a** dans le sérum permet une discrimination sensible (86%) des patients atteints de CaP par rapport aux patients atteints d'HBP, mais avec une spécificité modérée (56%). L'expression de **miR-21** et **miR-221** permet également de différencier (88% et 86%, respectivement) les patients atteints de CaP des patients contrôles (Yaman Agaoglu *et al.*, 2011).

La diminution d'expression de **miR-24** et l'augmentation d'expression de **miR-93**, **miR-106a**, **miR-141** et **miR-375** sont associées à des facteurs de mauvais pronostic et pour miR-141 et miR-375, à l'apparition de métastases (Brase *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2008; Moltzahn *et al.*, 2011; Yaman Agaoglu *et al.*, 2011). L'expression de **miR-141** et **miR-375** est également fortement associée au phénotype métastatique, dans les microvésicules circulantes dans le plasma de patients (Bryant *et al.*, 2012).

Enfin, la surexpression de **miR-21**, **miR-126**, **miR-141**, **miR-151-3p**, **miR-152**, **miR-200c**, **miR-375**, **miR-378***, **miR-423-3p** et la sous-expression de **miR-16**, **miR-205**, **miR-409-3p** sont observées chez les patients atteints de CRPC (Nguyen *et al.*, 2013; Watahiki *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011b). D'après Watahiki *et al.*, la meilleure combinaison pour discriminer les CRPC métastatiques des CaP localisés regroupe le dosage du PSA avec l'expression de miR-141, miR-151-3p et miR-16, qui permettent d'obtenir une sensibilité et une spécificité de 96% (Watahiki *et al.*, 2013)

Ces résultats indiquent que le criblage des miARNs circulants pourrait permettre l'identification de biomarqueurs du CaP dans le sérum ou le plasma. Il ressort, en particulier, un consensus sur la surexpression de miR-141 et miR-375 dans les patients atteints de CaP métastatiques.

2. Rôle de certains miARNs dans la tumorigenèse prostatique et la progression tumorale

Des études ciblées ont permis de préciser le rôle de certains miARNs, dérégulés dans le CaP, dans le développement et la maintenance du phénotype cancéreux. En particulier, certains miARNs jouent un rôle de suppresseur de tumeur ou d'oncogène en affectant ou promouvant, respectivement, la croissance, la formation de métastases (metastamir (Hurst *et al.*, 2009)) et la voie de signalisation androgénique.

a- miARNs suppresseurs de tumeur dans le CaP

Les miARNs suppresseurs de tumeurs comprennent les miARNs dont la perte est associée au développement des tumeurs (Tie and Fan, 2011). Les mécanismes d'action de ces miARNs sont les mêmes que ceux décrits pour les gènes suppresseurs de tumeurs, affectant le contrôle de la progression du cycle cellulaire, l'invasion tumorale et la formation de métastases. Plusieurs miARNs suppresseurs de tumeur dans le CaP ont été décrits dans la littérature et sont présentés dans la **Figure 17**.

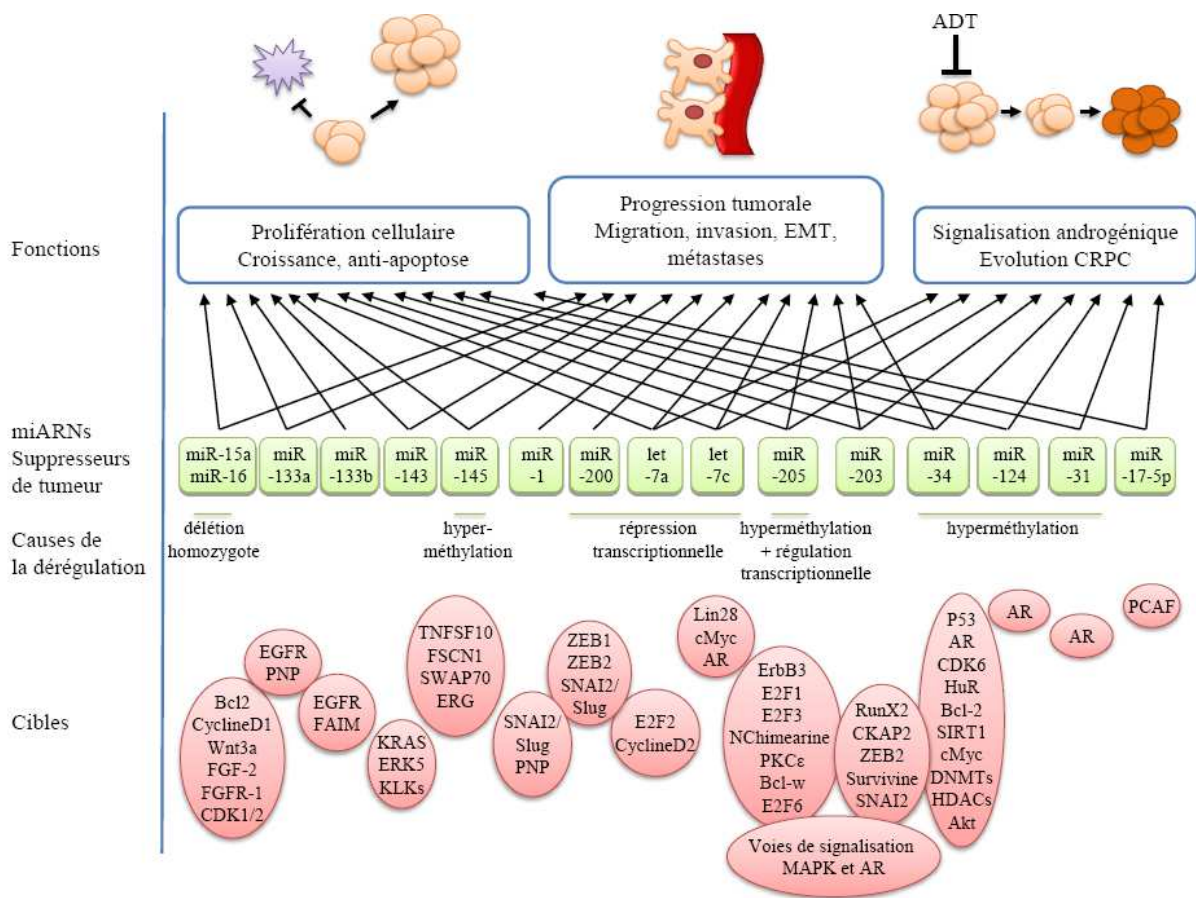


Figure 17 : Fonctions et cibles des miARNs suppresseurs de tumeur dans le cancer de la prostate.

Les miARNs suppresseurs de tumeur les plus étudiés dans le cancer de la prostate sont présentés dans cette figure. Leur rôle, la cause de leur dérégulation lorsqu'elle est connue et les gènes cibles identifiés sont indiqués. Toutes les références sont données dans les paragraphes suivants.

- **miR-15a et miR-16**

Le cluster **miR-15a** et **miR-16-1** se trouve dans la région chromosomique 13q14, qui présente une délétion fréquente dans le CaP, entraînant une diminution de l'expression de ces miARNs (Bonci *et al.*, 2008; Porkka *et al.*, 2011).

Ce cluster de miARNs régule plusieurs oncogènes, tels que la protéine anti-apoptotique Bcl-2, la cycline D1 et Wnt3a, qui régulent la survie, la prolifération et l'invasion des cellules prostatiques (Bonci *et al.*, 2008). De plus, miR-16 régule négativement l'expression des kinases cycline-dépendantes CDK-1 et -2, impliquées dans le cycle cellulaire et la prolifération (Takeshita *et al.*, 2010). La restauration de l'expression de miR-15a et miR-16 entraîne donc un arrêt de la croissance, l'apoptose et une forte régression de la tumeur prostatique, *in vivo* (Bonci *et al.*, 2008).

En étudiant les interactions entre les cellules prostatiques cancéreuses et les cellules stromales, cellules de soutien de la tumeur, il a été rapporté que miR-15a et miR-16 sont également sous-exprimés dans les fibroblastes aux alentours des tumeurs prostatiques (Musumeci *et al.*, 2011). Le facteur de croissance des fibroblastes, FGF-2 et son récepteur FGFR-1 sont des cibles de miR-15a et miR-16 et sont donc négativement régulés par ces miARNs. Ces deux molécules sont connues pour jouer des rôles importants dans les cellules stromales et tumorales en activant la survie, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (Musumeci *et al.*, 2011).

- **Famille miR-133**

La surexpression de **miR-133** (miR-133a et miR-133b) inhibe la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire de deux lignées de CaP AI, en ciblant le récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR (Tao *et al.*, 2012).

De plus, miR-133a, ainsi que miR-1, deux miARNs sous-exprimés dans le CaP, ciblent la phosphorylase nucléoside purine (PNP), impliquée dans la prolifération et l'invasion cellulaire dans le cancer de la vessie (Kojima *et al.*, 2012; Yamasaki *et al.*, 2012).

D'un autre côté, miR-133b sensibilise les cellules à la mort cellulaire induite par TNF- α et aux réponses pro-apoptotiques de TRAIL ou Fas/CD95, en particulier, en ciblant FAIM, un gène inhibiteur de l'apoptose induite par Fas/CD95 (Patron *et al.*, 2012).

- **miR-143 et miR-145**

miR-143 est un miARN suppresseur de tumeur et joue des rôles importants dans la carcinogenèse de nombreux tissus. Dans le CaP, miR-143 régule la prolifération et la migration cellulaire et active la réponse du CaP au docetaxel, en ciblant KRAS et par conséquent la voie de signalisation EGFR/RAS/MAPK (Xu *et al.*, 2011). De plus, miR-143 cible ERK5 (Clape *et al.*, 2009) et des kalikréines KLKs (White *et al.*, 2012), impliquées dans la prolifération cellulaire.

miR-143 et miR-145 sont significativement sous-exprimés dans les échantillons métastatiques de CaP (Peng *et al.*, 2011). La réexpression de ces deux miARNs restaure l'expression de l'E-cadhérine et réprime simultanément l'expression de la fibronectine dans les cellules PC-3, entraînant un phénotype moins invasif (Peng *et al.*, 2011)

miR-145 est sous-exprimé dans les échantillons de carcinomes prostatiques primaires (Suh *et al.*, 2011; Zaman *et al.*, 2010), et régule l'expression du proto-oncogène ERG (Hart *et al.*, 2013). Une surexpression de miR-145 dans les cellules PC-3 entraîne une augmentation de l'apoptose, en ciblant le gène pro-apoptotique TNFSF10 (Zaman *et al.*, 2010), ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Hart *et al.*, 2013). FSCN1 et SWAP70, des protéines de liaison à l'actine, sont également des cibles directes de miR-145 (Chiyomaru *et al.*, 2011; Fuse *et al.*, 2011). Elles jouent un rôle critique dans la migration cellulaire (Al-Alwan *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2012) et la répression de SWAP70 par miR-145 entraîne une inhibition significative de la migration et de l'invasion cellulaire des lignées de CaP (Chiyomaru *et al.*, 2011).

- **Famille miR-200**

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) désigne la transformation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Les cellules perdent alors leurs capacités d'adhésion intercellulaire et deviennent invasives. Cette transition est à la base de la formation de métastases. Plusieurs répresseurs de la transcription, qui régulent la perte de marqueurs épithéliaux, sont associés à ces processus, incluant ZEB1 et ZEB2 (Aigner *et al.*, 2007; Vandewalle *et al.*, 2005). La famille **miR-200** régule l'EMT en ciblant ZEB1, ZEB2 et SNAI2/Slug (Kong *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012b; Slabakova *et al.*, 2011). Slug est un répresseur direct de la transcription de miR-200 et miR-1. Slug et miR-200/miR-1 forment

donc une boucle de régulation positive (Liu *et al.*, 2012c). La sous-expression de miR-200/miR-1 conduit à l'amplification de l'EMT dans le CaP (Liu *et al.*, 2012c). De plus, la réduction de miR-200c entraîne la résistance au docetaxel, qui est réalisée *via* l'EMT (Puhr *et al.*, 2012).

- **Famille let-7**

La famille **let-7** est composée de suppresseurs de tumeur connus dans plusieurs types de cancer, incluant le CaP (Ozen *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007). Les cibles de ces miARNs sont impliquées dans les processus dérégulés au cours de la progression tumorale, tels que la prolifération et l'EMT (Mani *et al.*, 2008).

Let-7a cible et régule négativement l'expression de E2F2 et de la cycline D2, induisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Dong *et al.*, 2010).

L'expression de let-7a, ainsi que de let-7c est diminuée dans le CaP (Ozen *et al.*, 2008) et plus particulièrement dans les CRPC, pour let-7c (Leite *et al.*, 2011). Let-7c cible et régule négativement l'expression de Lin28, c-Myc et AR (Dangi-Garimella *et al.*, 2009; Leite *et al.*, 2009; Nadiminty *et al.*, 2012) et peut donc agir comme régulateur clé de l'expression de AR en ciblant sa transcription (Nadiminty *et al.*, 2012). La diminution de l'expression de let-7c active la croissance de cellules de CaP androgéno-sensibles en conditions de privation d'androgènes, *in vitro* (Nadiminty *et al.*, 2012).

- **miR-203 et miR-205**

miR-203 est sous-exprimé dans le CaP (Viticchie *et al.*, 2011). La surexpression de miR-203 dans les lignées cellulaires de CaP métastatiques de cerveau (DU145) ou d'os (PC-3) est suffisante pour inhiber la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire et pour inverser le phénotype de l'EMT (Viticchie *et al.*, 2011). Les gènes impliqués dans ces événements, tels que RunX2, CKAP2, ZEB2, la survivine et SNAI2, sont des cibles de miR-203 (Qu *et al.*, 2013; Saini *et al.*, 2011; Viticchie *et al.*, 2011). L'expression de miR-203 et miR-182 est réprimée durant l'EMT et la restauration de l'expression d'un de ces deux miARNs induit des caractéristiques de la transition mésenchymateuse-épithéliale (MET), processus inverse de l'EMT, probablement en régulant SNAI2.

miR-205 est également sous-exprimé dans le CaP (Watahiki *et al.*, 2011), en particulier *via* l'hyperméthylation du locus du gène *miR-205* (Hulf *et al.*, 2012). La restauration de son expression dans les cellules de CaP induit la MET marquée par une surexpression de l'E-cadhérine et une réduction de l'invasion cellulaire. Plusieurs marqueurs des cellules invasives tels que la N-chimaerine, ErbB3, E2F1, E2F5 et la protéine kinase C ϵ (PKC ϵ) sont des cibles de miR-205 (Gandellini *et al.*, 2009). De plus, il a été rapporté que miR-205 empêche les cellules de CaP d'envahir les espaces interstitiels, en préservant l'intégrité de la membrane basale (Gandellini *et al.*, 2012). D'un autre côté, il semblerait que miR-205 ait la capacité d'induire l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. En réprimant l'expression de gènes anti-apoptotiques Bcl-w et E2F6, miR-205 active l'apoptose des agents chimio-thérapeutiques dans les cellules de CaP (Bhatnagar *et al.*, 2010).

Plus récemment, il a été montré que miR-203 et miR-205 se coordonnent, avec miR-130a, pour réguler l'expression de composants clés des voies de signalisation de MAPK et AR (Boll *et al.*, 2013). Ces voies de signalisation sont cruciales pour le développement du CaP primaire et l'induction des CRPC. La restauration de l'expression de ces 3 miARNs dans une lignée de CaP AD, les LNCaP, entraîne des effets similaires à ceux de la privation en androgènes et inhibe la prolifération cellulaire en induisant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (Boll *et al.*, 2013).

• Famille miR-34

L'expression des miR-34a et miR-34c est régulée positivement par p53 (Rokhlin *et al.*, 2008) et la régulation de l'expression de miR-34a est également dépendante de AR. De plus, miR-34a cible AR et peut ainsi réguler l'expression de gènes androgéno-régulés dont le PSA. La coopération entre miR-34a et miR-34c peut donc jouer un rôle crucial dans l'apoptose dépendante de AR, *via* p53 (Rokhlin *et al.*, 2008).

Une expression forcée de miR-34a *in vitro* induit l'arrêt du cycle cellulaire en G1, la sénescence et l'apoptose, en partie en ciblant CDK6 (Lodygin *et al.*, 2008). Plusieurs autres gènes anti-apoptotiques (par exemple HuR, Bcl2 et SIRT1) ont aussi été identifiés comme cibles directes de miR-34a. La répression de l'expression de ces gènes par une expression ectopique de miR-34a peut atténuer la résistance au paclitaxel, dans les cellules PC-3 (Kojima *et al.*, 2010).

miR-34a cible également c-Myc dans les cellules de CaP. La répression de c-Myc altère l'activité du complexe transcriptionnel c-Myc-sKp2-Miz1, qui réprime RhoA, un régulateur de la migration et de l'invasion cellulaire (Chan *et al.*, 2010). miR-34a peut donc inhiber l'invasion des CaP en réprimant RhoA par c-Myc (Yamamura *et al.*, 2012).

De plus, miR-34b et miR-34c peuvent également cibler c-Myc (Benassi *et al.*, 2012). La surexpression de c-Myc dans les CaP induit une augmentation de l'expression de la protéase spécifique de l'ubiquitine 2a (USP2a) et inactive à son tour p53 et donc l'expression de plusieurs miARNs, dont miR-34b et miR-34c (Benassi *et al.*, 2012). En plus de l'inactivation par p53, l'expression de miR-34b, comme celle de miR-34a, peut être inhibée par hyperméthylation des CpG dans les CaP (Lodygin *et al.*, 2008; Majid *et al.*, 2013).

miR-34b inhibe également la prolifération cellulaire et l'EMT en ciblant Akt et réduisant ainsi l'expression de plusieurs marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine, l'E-Cadhérine et Snail (Majid *et al.*, 2013). miR-34c régule négativement E2F3 et Bcl-2 et est associé à la migration et l'invasion des CaP (Hagman *et al.*, 2010).

- **Autres miARNs suppresseurs de tumeur**

D'autres miARNs fonctionnent comme suppresseurs de tumeur durant la progression du CaP. L'expression de miR-31 est réduite par hyperméthylation dans sa région promotrice et régule directement l'expression de AR (Lin *et al.*, 2012). La restauration de l'expression de miR-31 induit un arrêt du cycle cellulaire des CaP par une répression mutuelle de miR-31 et AR.

miR-124 est un autre suppresseur de tumeur qui réprime directement l'expression de AR et inhibe la croissance cellulaire des CaP (Shi *et al.*, 2012). L'expression de miR-124 est réduite par méthylation de l'ADN dans les CaP.

miR-17-5p réprime l'expression du facteur associé à p300/CBP (PCAF), un coactivateur de AR, pour moduler l'activité transcriptionnelle de AR et inhiber la croissance cellulaire dans les cellules CaP en culture (Gong *et al.*, 2012).

miR-152 cible et régule négativement l'expression de TGF α entraînant une diminution des capacités de migration et d'invasion cellulaire *in vitro* (Zhu *et al.*, 2013).

b- OncomiRs dans le CaP

Les oncomiRs correspondent aux miARNs qui, quand ils sont constitutivement surexprimés, initient la formation de cancer ou favorisent son développement (Krutovskikh and Herceg, 2010). Le contrôle des oncomiRs peut affecter la carcinogénèse si les ARNm ciblés sont codés par des gènes suppresseurs de tumeur. De nombreux oncomiRs ont été rapportés comme étant anormalement exprimés dans de nombreuses tumeurs malignes (Medina *et al.*, 2010; Reshmi and Pillai, 2008; Wong *et al.*, 2012).

Des miARNs ayant une fonction oncogénique dans le CaP sont présentés **Figure 18**.

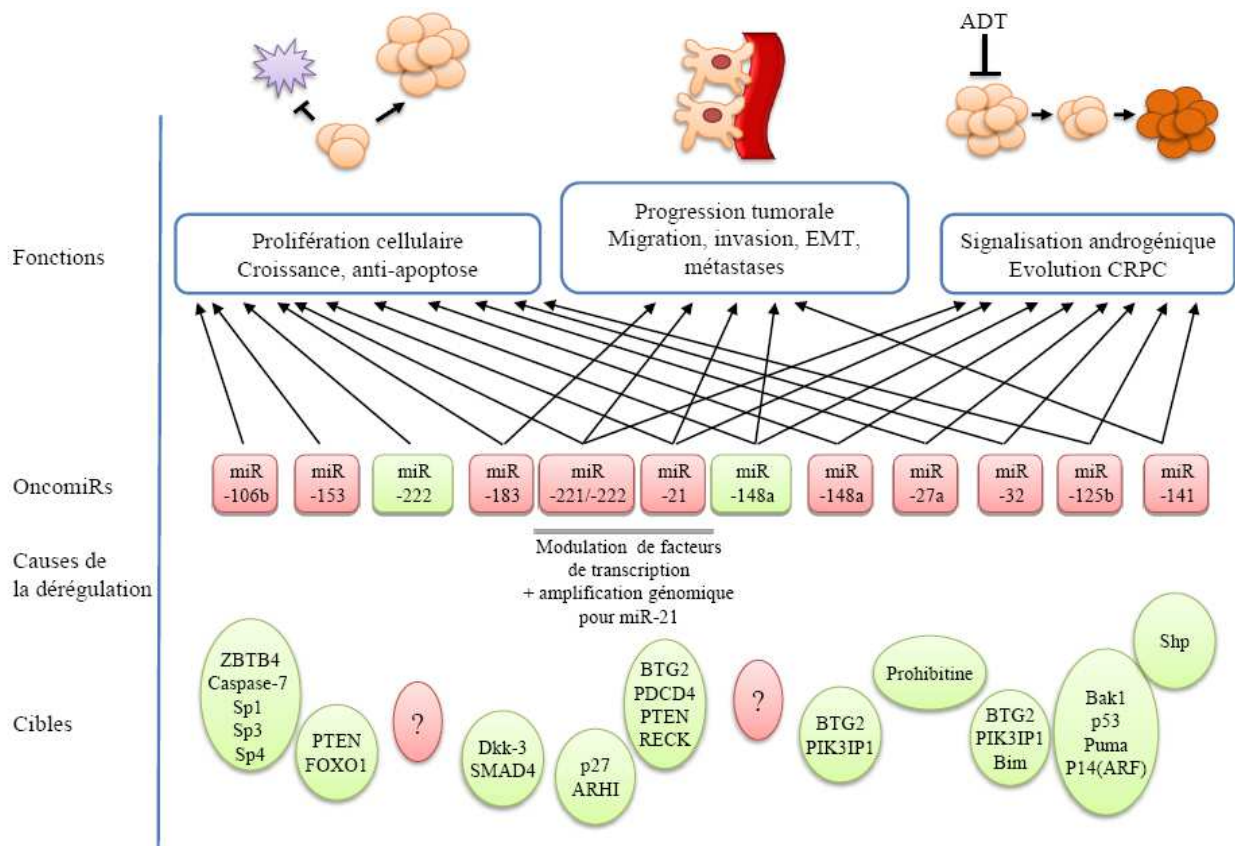


Figure 18 : Fonctions et cibles des miARNs oncomiRs dans le cancer de la prostate.

Les oncomiRs les plus étudiés dans le cancer de la prostate sont présentés dans cette figure. Leur rôle, la cause de leur dérégulation lorsqu'elle est connue et les gènes cibles identifiés sont indiqués. Toutes les références sont données dans les paragraphes suivants.

• miR-21

miR-21 est un miARN régulé positivement par les androgènes, *via* la fixation de AR dans la région promotrice de son gène (Ribas *et al.*, 2009). miR-21 est impliqué dans la prolifération cellulaire *in vitro*, active la croissance tumorale du CaP *in vivo* et est impliqué dans la résistance à la castration.

En plus de AR, d'autres facteurs peuvent être impliqués dans la régulation de l'expression de miR-21. Plusieurs éléments activateurs de la transcription, tels que des sites de liaison de AP-1 et STAT3 sont également présents dans la région promotrice de *miR-21* (Fujita *et al.*, 2008). De plus, le gène *miR-21* (17q23.1) est amplifié dans plusieurs types de cancer dont le CaP (Kasahara *et al.*, 2002).

L'interféron IFN peut induire l'expression de miR-21 de façon STAT3 dépendante (Yang *et al.*, 2010), suggérant que miR-21 puisse être impliqué dans l'apoptose induite par IFN (Yang *et al.*, 2010). D'un autre côté, miR-21 cible et régule négativement PDCD4, un suppresseur de tumeur associé à l'apoptose (Lu *et al.*, 2008). miR-21 semble être impliqué dans la chimiorésistance en régulant PDCD4 dans une lignée cellulaire AI, PC-3 (Shi *et al.*, 2010). miR-21 cible également PTEN induisant une augmentation de l'expression de HIF-1 α et VEGF, ainsi que l'activation d'AKT et ERK1/2 qui entraîne de façon synergique l'angiogenèse tumorale (Liu *et al.*, 2011b). Parmi ces 4 gènes, l'inhibition de HIF-1 α à elle-seule bloque les effets de miR-21 sur l'angiogenèse tumorale, indiquant que HIF-1 α est essentiel pour l'activation de l'angiogenèse par miR-21 (Liu *et al.*, 2011b). De plus, la protéine basale BTG2 est une autre cible importante de miR-21 (Coppola *et al.*, 2012). Durant le processus de tumorigenèse, la perte de BTG2 est associée à la transformation des cellules prostatiques normales basales vers des cellules exprimant des marqueurs luminaux, ainsi que l'apparition de caractéristiques de l'EMT (Lawson *et al.*, 2010). Un autre gène de l'invasion régulé par miR-21 est RECK, un inhibiteur des métalloprotéinase matricielles. La restauration de l'expression de RECK, en neutralisant l'expression de miR-21, réprime les taux de métalloprotéinases matricielles et inverse le phénotype invasif (Reis *et al.*, 2012).

Cependant, certains résultats sont controversés, en particulier l'inhibition de miR-21 semble être insuffisante pour moduler l'expression de PDCD4 et PTEN ; et la surexpression de miR-21, seule, a un effet limité sur l'activation de la prolifération cellulaire et l'invasion dans les CaP (Folini *et al.*, 2010).

- **miR-32 et miR-148a**

miR-32 et miR-148a sont des miARNs androgéno-régulés offrant, ensemble ou indépendamment, un avantage significatif de croissance aux cellules LNCaP, des cellules hormono-sensibles de CaP. Cependant, la fonction de ces deux miARNs sur la stimulation de la prolifération est différente, dans le sens où miR-32 réduit l'apoptose et miR-148a active la croissance cellulaire (Jalava *et al.*, 2012; Murata *et al.*, 2010).

De plus, Jalava *et al* (Jalava *et al.*, 2012) ont rapporté que miR-32 et miR-148, en plus de miR-21, ciblent BTG2. Une surexpression de miR-32 et/ou miR-148a réprime également l'expression de PIK3IP1, une protéine membranaire qui induit l'apoptose (He *et al.*, 2008), ainsi qu'un autre activateur apoptotique, Bim (Ambs *et al.*, 2008). Dans les lignées cellulaires AI, seule l'expression de miR-148a est dérégulée et diminue par rapport aux cellules LNCaP AD ou les cellules épithéliales prostatiques normales PrEC (Fujita *et al.*, 2010). La réintroduction de miR-148a n'inhibe pas seulement la croissance cellulaire, la migration et l'invasion mais active aussi la sensibilité au paclitaxel dans les cellules PC-3.

Ces données suggèrent un changement de la fonction de miR-148a, qui joue un rôle d'oncomiR dans les CaP hormono-sensibles et un rôle de suppresseur de tumeur dans les CRPC (Fujita *et al.*, 2010).

- **miR-125b**

miR-125b est également androgéno-régulé (Takayama *et al.*, 2011). La surexpression de miR-125b dans la lignée cellulaire AD LNCaP stimule sa croissance et sa malignité et rend ces cellules résistantes au retrait des androgènes (DeVere White *et al.*, 2009). Une expression forcée de miR-125b dans les cellules AI active la prolifération cellulaire en réprimant l'expression de Bak1, un gène pro-apoptotique (Shi *et al.*, 2007).

En plus de Bak1, deux autres gènes apoptotiques, p53 et Puma, sont des cibles de miR-125b (Shi *et al.*, 2011). Une surexpression de miR-125b dans les cellules LNCaP diminue fortement les niveaux d'expression de p53 et de son effecteur direct Puma, alors que l'inhibition de miR-125b sensibilise les cellules CaP à des interventions thérapeutiques variées (Shi *et al.*, 2011).

Une autre cible de miR-125b, p14(ARF), contribue à la régulation anti-apoptotique (Amir *et al.*, 2013). Ce nouveau gène cible identifié de miR-125b régule négativement Mdm2,

une protéine affectant p53 et ses gènes cibles (dont puma). De plus, une surexpression de miR-125b dans les cellules PC-3 déficientes en p53, induit une diminution de p14(ARF) qui entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire indépendamment de p53.

- **miR-221 et miR-222**

Il n'existe actuellement pas de consensus sur la dérégulation de miR-221 et miR-222 dans le CaP. Certains les trouvent sous-exprimés dans le CaP (Tong *et al.*, 2009), tandis que d'autres les trouvent surexprimés (Mercatelli *et al.*, 2008).

Galardi *et al* (Galardi *et al.*, 2007) ont rapporté que l'inhibition de l'expression de miR-221/222 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, en surexprimant l'inhibiteur de cycle cellulaire p27 et réduisant la capacité de former des clones dans les cellules PC-3. La surexpression de miR-221/222 par la thrombine (Green and Karparkin, 2010) bloque l'expression de p27 qui régule à son tour une série de facteurs du cycle cellulaire tels que Skp2, cycline A et cycline D1, entraînant le passage de la phase G1 à la phase S et activant le potentiel de formation des colonies (Hu *et al.*, 2009). En plus, ARHI a été récemment identifiée comme nouvelle cible de miR-221/222 (Chen *et al.*, 2011a; Lin *et al.*, 2011). ARHI est un gène suppresseur de tumeur dont l'expression est souvent diminuée dans les cancers (Bao *et al.*, 2002). La suppression de l'expression de miR-221/222 induit significativement l'expression de ARHI et inhibe la croissance cellulaire des PC-3, *in vitro* (Chen *et al.*, 2011a; Lin *et al.*, 2011). Ces résultats indiquent que miR-221/222 fonctionnent comme oncomiRs pour promouvoir la croissance des PC-3, en modulant le contrôle du cycle cellulaire. Cependant, des études plus récentes indiquent que miR-222 joue un rôle de suppresseur de tumeur en régulant la progression du cycle cellulaire dans les lignées de CaP (Fuse *et al.*, 2012).

Il semblerait donc que ces miARNs puissent avoir un rôle oncogénique ou suppresseur de tumeur au sein du même cancer.

- **Autres oncomiRs**

miR-106b est surexprimé dans les CaP et l'inhibition de son expression active l'arrêt du cycle cellulaire par p21 (Li *et al.*, 2011). miR-106b cible directement la caspase-7, un composant clé de la voie de signalisation de l'apoptose (Hudson *et al.*, 2012). miR-106b

réprime également l'expression du répresseur transcriptionnel ZBTB4 et surexprime les facteurs de transcription Sp (protéines de spécificité), Sp1, Sp3 et Sp4, dont la surexpression est détectée dans les lignées cellulaires de CaP (Kim *et al.*, 2012).

miR-27a est un oncomiR androgéno-régulé dans le CaP. Par liaison de AR sur son promoteur, les androgènes régulent l'expression de miR-27a et accélèrent sa maturation. miR-27a cible directement la prohibitine, un suppresseur de tumeur et un corépresseur de AR (Fletcher *et al.*, 2012).

miR-153 régule directement l'expression de PTEN et active la transition du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire, en activant la voie de signalisation Akt et inhibant l'activité transcriptionnelle de FOXO1 (Wu *et al.*, 2012b).

miR-141, qui est surexprimé dans le sérum de patients atteints de CaP métastatiques, joue un rôle d'oncogène en ciblant un récepteur orphelin, Shp, qui est un corépresseur de AR (Xiao *et al.*, 2012). Une surexpression de miR-141 augmente donc l'activité transcriptionnelle de AR.

La diminution de l'expression de miR-183, dont l'expression est plus élevée dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains, entraîne une diminution de la croissance cellulaire et de la motilité, *in vitro*, ainsi qu'une diminution de la croissance tumorale, *in vivo*, chez la souris (Ueno *et al.*, 2013). Les gènes suppresseurs de tumeur Dkk-3 et SMAD4 ont été identifiés comme étant des cibles de miR-183.

c- miARNs et cellules souches du CaP

Une masse tumorale contient une population variée de cellules avec différentes caractéristiques en terme de statut de différenciation (Prince *et al.*, 2007). Elle est composée en général de cellules entièrement différenciées dans les régions extérieures et de progéniteurs ou de cellules ressemblant aux cellules souches dans les régions centrales (Clarke and Fuller, 2006). Ces cellules ressemblant aux cellules souches représentent une petite sous-population qui se comporte différemment des autres cellules tumorales dans la même masse tumorale. Cette sous-population pourrait être à l'origine de l'initiation de la tumeur, de la résistance thérapeutique et de la formation des métastases. Ces cellules sont appelées cellules souches cancéreuses (CSC) (Clarke and Fuller, 2006). Les miARNs peuvent jouer un rôle dans l'acquisition des caractéristiques cellulaires des cellules ressemblants aux cellules souches, durant la progression tumorale (Liu and Tang, 2011).

Des informations suggèrent que les CSC des CaP (PCSC) peuvent avoir des caractéristiques de l'EMT qui sont étroitement liées à la rechute, la perte de sensibilité au traitement et aux métastases des CaP (Mani *et al.*, 2008; Thiery, 2002). Des études récentes soutiennent la notion que des miARNs spécifiques (miR-34, miR-27b, let-7, miR-143, miR-145, miR-320 et miR-708) peuvent être impliqués dans la régulation des PCSC (Fan *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2012; Kashat *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2012a; Saini *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2011). L'expression de certains de ces miARNs est dérégulée dans les populations cellulaires exprimant des marqueurs PCSC. Ces miARNs peuvent être impliqués dans des processus oncogéniques ou suppresseur de tumeur classiques (prolifération, apoptose, métastases...), mais également dans l'acquisition des caractéristiques des cellules cancéreuses ressemblant aux cellules souches (régulation de facteurs de différenciation, de l'expression des marqueurs de PCSC...).

3. Utilisation des miARNs dans la thérapie cancéreuse

Bien qu'aucun miARN ne soit actuellement utilisé dans la thérapie anti-cancéreuse du CaP, cette approche pourrait devenir une stratégie efficace, permettant de réguler l'expression de plusieurs gènes. Le ciblage des miARNs pour la thérapie cancéreuse est basé soit sur la surexpression sélective du miARN, soit sur l'inhibition sélective de l'expression du miARN.

La restauration de l'expression des miARNs peut être réalisée *via* différents types de molécules capables de mimer les miARNs natifs. Des molécules d'ARN double brins, mimant les précurseurs de miARN, sont utilisées. La caractéristique particulière de ces précurseurs synthétiques est une modification chimique permettant la production exclusive du miARN mature d'intérêt, mais qui préserve leur capacité à interagir avec les cibles naturelles. Le clonage des gènes miR dans des systèmes de vecteurs viraux représente une autre stratégie possible pour restaurer de l'expression des miARNs. L'utilisation de vecteurs viraux permet la réexpression stable des miARNs, qui s'adapte bien à la thérapie génique tandis que les oligonucléotides synthétiques induisent une réponse uniquement transitoire.

En ce qui concerne l'inhibition sélective de l'expression du miARN, plusieurs molécules existent :

- Les oligonucléotides anti-miR sont des séquences simple-brin complémentaires du miARN ciblé (Sotillo and Thomas-Tikhonenko, 2011). En se liant avec un miARN donné, l'anti-miR joue un rôle d'antagoniste, empêchant l'interaction avec les ARNm ciblés.
- Les antagomiRs sont des oligonucléotides anti-miR avec des modifications chimiques permettant d'augmenter leur stabilité dans un environnement intracellulaire ou dans les fluides biologiques, en inhibant leur dégradation (Sotillo and Thomas-Tikhonenko, 2011). Plusieurs modifications chimiques ont été introduites, soit dans les sucres, soit dans le squelette (Stenvang *et al.*, 2012). Les deux modifications des sucres les plus utilisées sont les 2'-O-méthylation (Hutvagner *et al.*, 2004) et les acides nucléiques fermés (Locked Nucleic Acid LNA) (Stenvang *et al.*, 2008). Récemment, une nouvelle stratégie basée sur la modification LNA appelé « tiny LNA » (minuscule LNA) a été utilisée pour cibler simultanément différents miARNs appartenant à la même famille, en exploitant la conservation de la région seed (Obad *et al.*, 2011).
- Les « sponges » ont été développés comme nouvelle approche pour inhiber les miARNs. Ces « sponges » sont composés de multiples sites de 3'UTR d'ARNm complémentaires à un miARN spécifique, positionnés en tandems (Ebert *et al.*, 2007). Les sponges se lient alors de façon compétitive aux miARNs et inhibent l'activité d'une famille de miARNs partageant une même séquence seed. Cette stratégie permet une inhibition transitoire des miARNs, ou à long terme s'ils sont portés par des vecteurs lentiviraux.
- La dernière approche pour moduler l'expression des miARNs exploite les médicaments capables de modifier la transcription des miARNs. Plus de 1 000 petites molécules organiques ont été criblées pour identifier un inhibiteur de la transcription de miR-21 et le diazobenzène et ses dérivés sont capables de supprimer de manière spécifique la transcription de ce miARN (Gumireddy *et al.*, 2008). De même, la petite molécule enoxacine est capable d'activer la production de miARNs suppresseurs de tumeurs en se liant à une protéine de la biosynthèse des miARNs (Melo *et al.*, 2011).

Bien que la thérapie basée sur les miARNs semble être une stratégie efficace, il reste des questions non résolues, dont le manque de spécificité par rapport au tissu ciblé, l'absence de systèmes de distribution optimum, une mauvaise absorption cellulaire et un risque de toxicité systémique. Des systèmes multiples de distribution ont été examinés (Garzon *et al.*, 2010) et les thérapies par miARNs pour interférer avec l'interaction miARN/ARNm ont été essayées dans le cadre pré-clinique (Ebert and Sharp, 2010).

4. Conclusion

Toutes ces études indiquent que les miARNs dérégulés dans le CaP peuvent exercer leurs fonctions de suppresseurs de tumeur ou d'oncogènes et jouer d'importants rôles dans la progression de la maladie, la résistance aux traitements, l'établissement des PCSC, l'orientation vers l'EMT et la formation des métastases.

L'étude détaillée de la fonction des miARNs par l'identification de leurs gènes cibles permettra de mieux comprendre leur rôle dans la tumorigenèse et la progression du CaP. Ceci pourra, sans doute, permettre de définir correctement une application clinique du dosage des miARNs pour le diagnostic et le pronostic, ainsi que d'identifier de nouveaux outils thérapeutiques.

PRESENTATION DU PROJET

I. Contexte de l'étude

Les androgènes, *via* le récepteur aux androgènes AR, jouent un rôle important dans la physiologie prostatique normale, ainsi que dans l'initiation et la progression du CaP (Cunha *et al.*, 2004; Wang and Tindall, 2011).

Cette propriété androgéno-dépendante est utilisée dans le traitement par privation androgénique du CaP localement avancé ou métastatique. L'application de traitements visant à une castration chimique anti-androgénique parvient pour un temps à réduire la tumeur. Cependant, ce traitement n'est presque jamais curatif, les cellules cancéreuses s'adaptent *via* des altérations fonctionnelles dans la voie de signalisation de AR ou dans la synthèse des androgènes et les patients développent un CaP résistant à la castration (CRPC) (Leibowitz-Amit and Joshua, 2012).

La progression tumorale est une succession d'événements complexes au cours desquels une cellule normale acquiert progressivement des capacités de prolifération non contrôlée, de migration, d'invasion et de dissémination métastatique.

Bien que certaines dérégulations moléculaires aient été mises en évidence, il n'existe actuellement aucun marqueur biologique de progression tumorale dans le cadre du CaP. Il n'existe donc aucun moyen de prévoir comment va évoluer la tumeur jusqu'à une forme létale.

L'amélioration de la survie des patients atteints de CaP représente un défi majeur et demande de trouver de nouvelles stratégies de prédiction d'évolution de la maladie et de nouveaux traitements. Ceci implique par conséquent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de la progression tumorale et donc une analyse détaillée des gènes et des voies de signalisation impliqués. En particulier, une meilleure appréhension de la maladie implique de s'intéresser aux mécanismes moléculaires qui régissent spécifiquement l'expression des gènes sous contrôle des androgènes.

AR contrôle la transcription de nombreux gènes cibles codant pour des protéines ou des ARNs non codant dont les miARNs (Narayanan *et al.*, 2010).

Impliqués dans la quasi-totalité des processus biologiques, une modification du profil d'expression des miARNs contribue, par voie de conséquence, au développement de nombreuses pathologies, y compris cancéreuses. De plus, la découverte de profils d'expression des miARNs propres à certains cancers (miRNome spécifique du tissu et/ou du stade de la maladie) montre la possibilité d'utiliser certains miARNs comme nouveaux biomarqueurs de diagnostic ou de pronostic.

L'étude de la voie de signalisation de AR, incluant les miARNs effecteurs, est donc une stratégie prometteuse pour identifier des biomarqueurs du développement tumoral prostatique, ainsi que des cibles potentielles dans le développement de nouvelles thérapies.

II. Objectifs

Le but de ce projet de thèse est d'identifier des effecteurs de la voie de signalisation androgènes-AR, *via* les miARNs, et d'étudier leur fonction. L'identification des gènes cibles de AR par la recherche de miARNs androgéno-régulés était une approche peu répandue lorsque nous avons démarré ce projet.

Ainsi mes objectifs de thèse ont consisté à :

- i) identifier des miARNs dont l'expression est régulée par les androgènes (à partir d'analyses d'expression à grande échelle),
- ii) caractériser les fonctions d'un miARN candidat issu de ce crible et de certains de ces gènes cibles dans des processus clés du développement du cancer de la prostate,
- iii) évaluer l'expression de ce miARN d'intérêt sur des échantillons cliniques issus de patients atteints de cancer de la prostate et traités par chirurgie (prostatectomie).

RESULTATS

I. miR-135a, un miARN androgéno-régulé

1. Identification de miR-135a comme miARN androgéno-régulé

Pour identifier de nouveaux miARNs régulés par les androgènes dans les cellules prostatiques, nous avons comparé le miRNome de cellules LNCaP, androgéno-sensibles, cultivées pendant 2, 8, 24 et 48 heures en présence ou en absence de 1 nM de R1881. Une analyse de l'expression de 377 miARNs a été réalisée, par RT-PCRq à haut débit. Nous avons observé que l'expression de miR-135a et miR-135b matures, les deux membres de la famille des miR-135, sont statistiquement surexprimés après stimulation par les androgènes. Parce que l'expression de miR-135a était plus fortement induite que celle de miR-135b, miR-135a a été choisi pour des analyses plus approfondies.

Pour caractériser la régulation de l'expression de miR-135a par les androgènes, nous avons, dans un premier temps, traité les cellules LNCaP avec des concentrations croissantes de R1881 (10^{-11} à 10^{-7} M) et quantifié les taux de miARN mature par RT-PCRq. Une réponse maximale d'expression de miR-135a a été observée en présence de 10^{-9} M à 10^{-7} M de R1881 (**Figure 19A**). La concentration de 1 nM a donc été choisie pour les expériences suivantes. Les cellules LNCaP ont ensuite été traitées au R1881 à différent temps (2, 4, 8, 18 et 24 h). Comme présenté dans la **Figure 19B**, l'expression de miR-135a augmente après 8 h de traitement androgénique (différentiel de 2 par rapport aux cellules contrôles), pour atteindre une augmentation du taux d'expression de 10 fois après 24h de traitement.

Nous avons également montré que l'induction de l'expression de miR-135a par le R1881 est inhibée en présence d'un antagoniste de AR, le bicalutamide (diminution du différentiel d'expression de 76,5%, **Figure 19C**) et qu'elle est fortement réduite après transfection d'un siARN anti-AR (si-AR) (diminution du différentiel d'expression de 70%, **Figure 19D**). Ces données démontrent l'implication de AR dans la régulation de l'expression de miR-135a par les androgènes.

Enfin, l'induction de l'expression de miR-135a dans les cellules LNCaP traitées au R1881 n'est pas affectée par la présence de cycloheximide (**Figure 19E**), suggérant que la régulation androgénique de l'expression de miR-135a est directement induite par AR, sans nécessité de synthèse de facteurs protéiques intermédiaires.

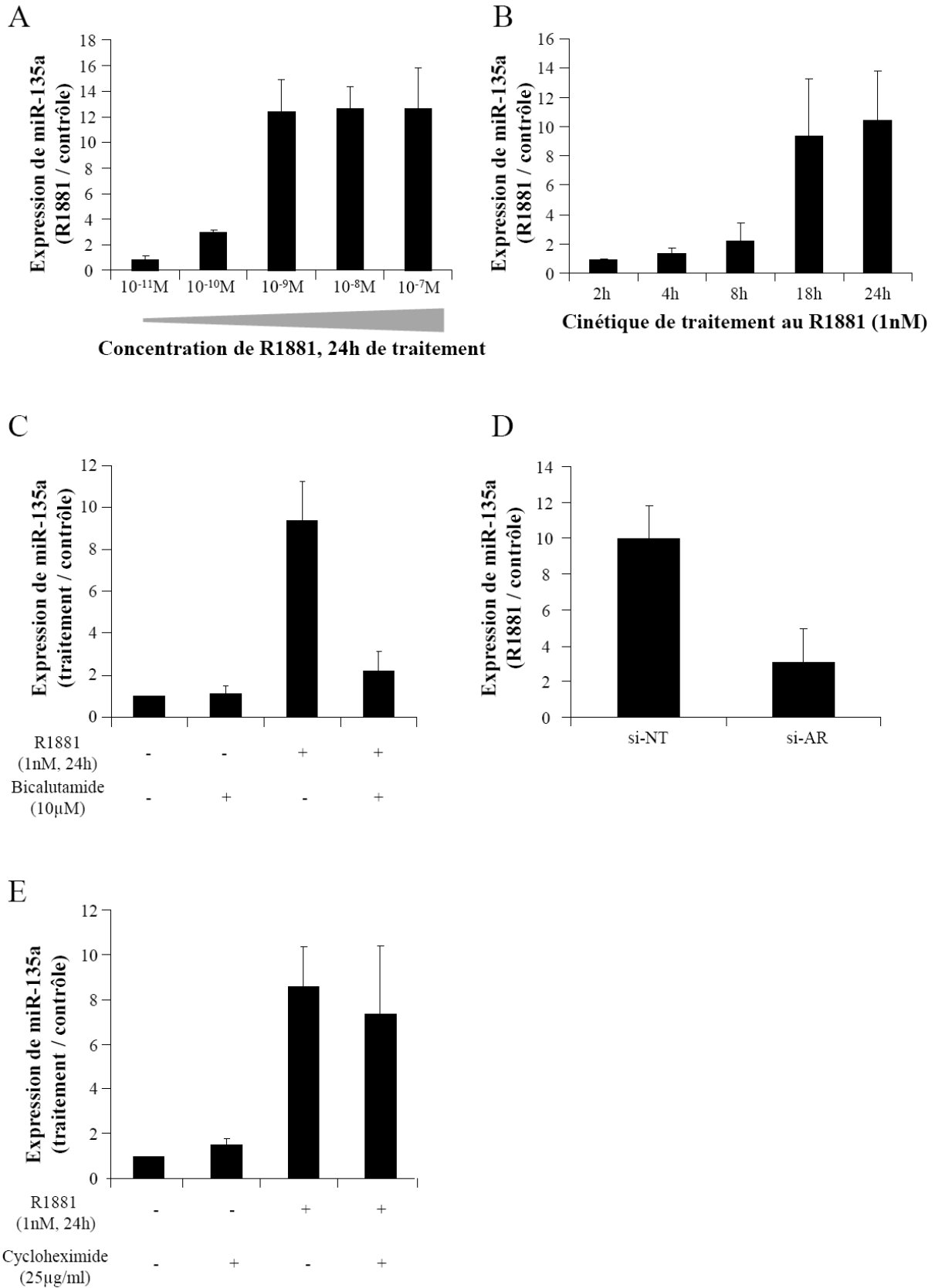


Figure 19 : Régulation androgénique de l'expression de miR-135a.

L'expression de miR-135a mature a été quantifiée par RT-PCRq. A l'exception du panel A, les cellules LNCaP ont été stimulées avec 1 nM d'androgène synthétique R1881. Pour l'ensemble des panels, les données sont

RESULTATS

présentées en tant que différentiel d'induction des cellules traitées par rapport aux cellules contrôles. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

A. Expression de miR-135a dans les cellules LNCaP stimulées avec des doses croissantes de R1881 pendant 24h, en comparaison aux cellules contrôles non stimulées.

B. Cinétique d'expression de miR-135a dans les cellules LNCaP stimulées par les androgènes, en comparaison aux cellules contrôles non stimulées.

C. Taux d'expression de miR-135a dans les cellules LNCaP, soumises à un traitement anti-androgénique (10 μ M bicalutamide), une stimulation androgénique (R1881), ou un traitement combiné (R1881 + bicalutamide), en comparaison aux cellules contrôles non traitées.

D. Taux d'expression de miR-135a dans les cellules LNCaP transfectées pendant 48h avec 50nM d'ARN interférent (siARN) dirigé contre le récepteur aux androgènes AR (si-AR) ou avec un si-contrôle (si-NT), et soumises ou non à un traitement androgénique (R1881 ; 24 h).

E. Taux d'expression de miR-135a dans les cellules LNCaP, soumises à un traitement à la cycloheximide, une stimulation androgénique (R1881), ou un traitement combiné (R1881 + cycloheximide), en comparaison aux cellules contrôles non traitées.

2. AR régule l'expression de miR-135a au niveau transcriptionnel

MiR-135a mature peut être produit à partir de deux gènes *miR-135a* dans le génome humain. *MiR-135a1* est localisé sur le chromosome 3 et *miR-135a2* sur le chromosome 12. Afin de déterminer si cette régulation androgénique est réalisée à un niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel, nous avons étudié le taux d'expression des gènes *miR-135a*, dans des cellules stimulées ou non, en quantifiant le taux de chaque pri-miARN (**Figure 20A**). L'expression du pri-miR-135a1 n'a pas été modifiée tandis que l'expression du pri-miR-135a2 est augmentée, sous stimulation androgénique, suggérant une régulation transcriptionnelle du gène *miR-135a2* par AR.

L'étude de la cinétique d'expression du pri-miR-135a2 a révélé une augmentation rapide de son expression dans la première heure suivant le traitement androgénique. Le différentiel d'induction augmente jusqu'à 10 h puis diminue, tandis que l'induction de l'expression de miR-135a mature par les androgènes commence vers 6 h et augmente jusqu'à 24 h (**Figure 20B**). Cette augmentation de quantité de miR-135a mature après le traitement androgénique résulte de l'activation transcriptionnelle du gène *miR-135a2*, mais pourrait également résulter de l'activation du processus de maturation du pri-miARN. Pour différencier ces deux niveaux d'action, nous avons bloqué la transcription par un traitement à l'actinomycine D, après stimulation androgénique. Dans un premier temps, nous avons confirmé, comme attendu, que le traitement à l'actinomycine D induisait, dès 6 h, une forte et constante diminution de l'expression du pri-miR-135a2 (**Figure 20C**). Pour étudier l'effet combiné du R1881 et de l'actinomycine D sur l'expression de miR-135a, l'actinomycine D a été ajoutée 6 h après la stimulation androgénique, un tel décalage dans le temps permettant l'activation de la transcription du pri-miR-135a2 par les androgènes. Comme montré précédemment (**Figure 19B**), le taux de miR-135a mature augmente fortement après l'ajout de R1881 (**Figure 20D**). Cependant, en présence d'actinomycine D, cette augmentation est fortement réduite à 48 h (**Figure 20D**).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'augmentation de la quantité de miR-135a mature après stimulation androgénique résulte principalement de l'activation transcriptionnelle du gène *miR-135a2* et que l'effet sur le processus de maturation du pri-miARN est marginal.

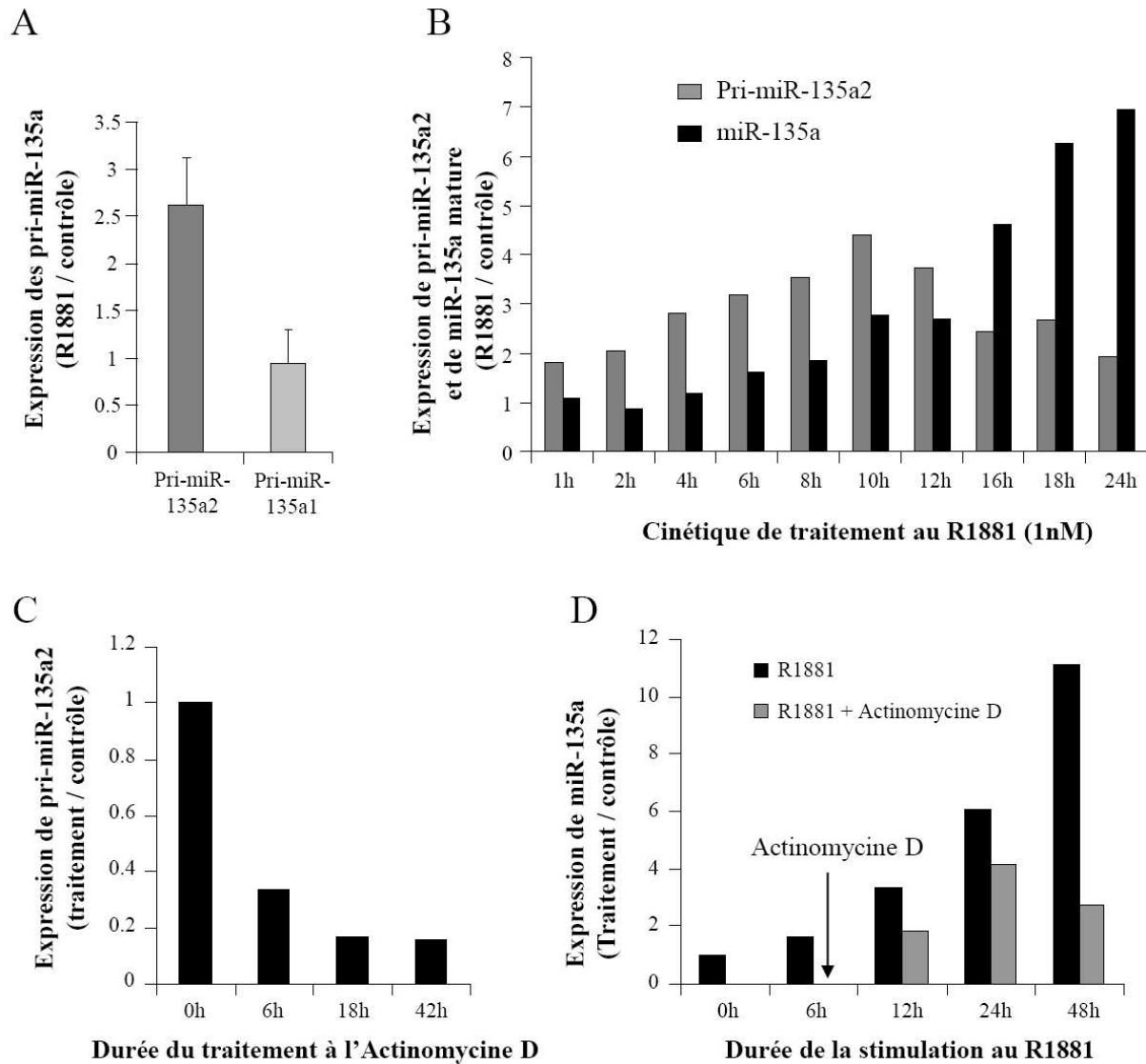


Figure 20 : Régulation transcriptionnelle de l'expression de miR-135a par les androgènes.

Les cellules LNCaP ont été soit stimulées avec 1nM d'androgène synthétique R1881 (panels A-B), soit traitées par 1 μ M d'Actinomycine (panel C), soit à la fois stimulées et traitées à l'Actinomycine (panel D). L'expression de miR-135a (mature ou pri-miR) a été quantifiée par RT-PCRq. Les données sont présentées en tant que différentiel d'induction dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles.

A. Taux d'expression des pri-miR-135a1 et pri-miR-135a2 dans les cellules LNCaP stimulées au R1881 pendant 24 h, en comparaison aux cellules contrôles non stimulées. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

B. Cinétique d'expression du pri-miR-135a2 et du miR-135a mature dans les cellules LNCaP stimulées au R1881, en comparaison aux cellules contrôles non stimulées.

C. Expression du pri-miR-135a2 dans les cellules LNCaP traitées à l'Actinomycine D (1 μ M), par rapport aux cellules contrôles.

D. Expression de miR-135a dans les cellules LNCaP traitées au R1881 ou au R1881 + Actinomycine D par rapport aux cellules contrôles. L'Actinomycine D (1 μ M) a été ajoutée 6 h après la stimulation au R1881.

3. Mécanismes de régulation de la transcription du gène miR-135a2

La séquence de miR-135a2 est localisée dans un intron du gène non codant *RMST* (MI0000453, <http://www.mirbase.org>). Ce gène, ainsi que le miARN miR-1251, également présent dans un intron de *RMST* (**Figure 20A**), ne sont pas exprimés dans les cellules LNCaP (données non présentées), suggérant que le gène *miR-135a2* possède ses propres séquences de régulation de la transcription. Le promoteur et le site de début de transcription de *miR-135a2* n'étaient pas encore caractérisés. Par 5'RACE, nous avons donc recherché et identifié un site de début de transcription localisé 554 paires de bases en amont de la première base du pré-miR-135a2 et qui correspond au début d'une séquence EST (Expressed Sequence Tags, gb CA311800) (**Figure 21A**).

Comme miR-135a est principalement régulé de façon transcriptionnelle par les androgènes, *via* AR, des éléments de réponse aux androgènes (AREs) ont été recherchés dans la région du gène *miR-135a2*. En utilisant le logiciel MatInspector de Genomatix, nous avons identifié sept AREs putatifs dans les 10 kb en amont du pré-miR-135a2 (**Figure 21B**). Les activités transcriptionnelles de trois régions contenant des AREs (-8800/-7600; -6740/-5500; -1380/0) ont été analysées par des tests rapporteurs luciférase. Seule la construction contenant le fragment -6740/-5500 induit une activation (de 3,6 fois) de l'expression luciférase en réponse aux androgènes (**Figure 21C**). Cette construction contient quatre AREs potentiels, appelés ARE-2 à ARE-5. Puisque l'ARE-2 (caagtacagcttGTTTctcc), localisé à -5605 pb, est très proche de la séquence ARE consensus (Denayer *et al.*, 2010), le site a été muté (caagtaAagcttTTTctcc) pour vérifier son rôle dans l'induction androgénique. Comme montré dans la **Figure 21C**, l'induction de l'expression luciférase par le R1881 est totalement abolie par les mutations.

Enfin, en réalisant une immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) avec un anticorps spécifique de AR, nous avons démontré, dans les cellules LNCaP, une augmentation (de 4 fois) de la liaison de AR dans la région contenant l'ARE-2, après stimulation au R1881 (**Figure 21D**). Dans ces échantillons, nous avons confirmé la liaison de AR sur la chromatine d'un gène cible connu, PSA (KLK3) et à l'inverse, l'absence de liaison sur le gène non ciblé TBP.

En conclusion, nous avons identifié un miARN androgéno-régulé, ainsi qu'un mécanisme d'action de AR pouvant expliquer l'augmentation de l'expression de miR-135a après stimulation androgénique.

RESULTATS

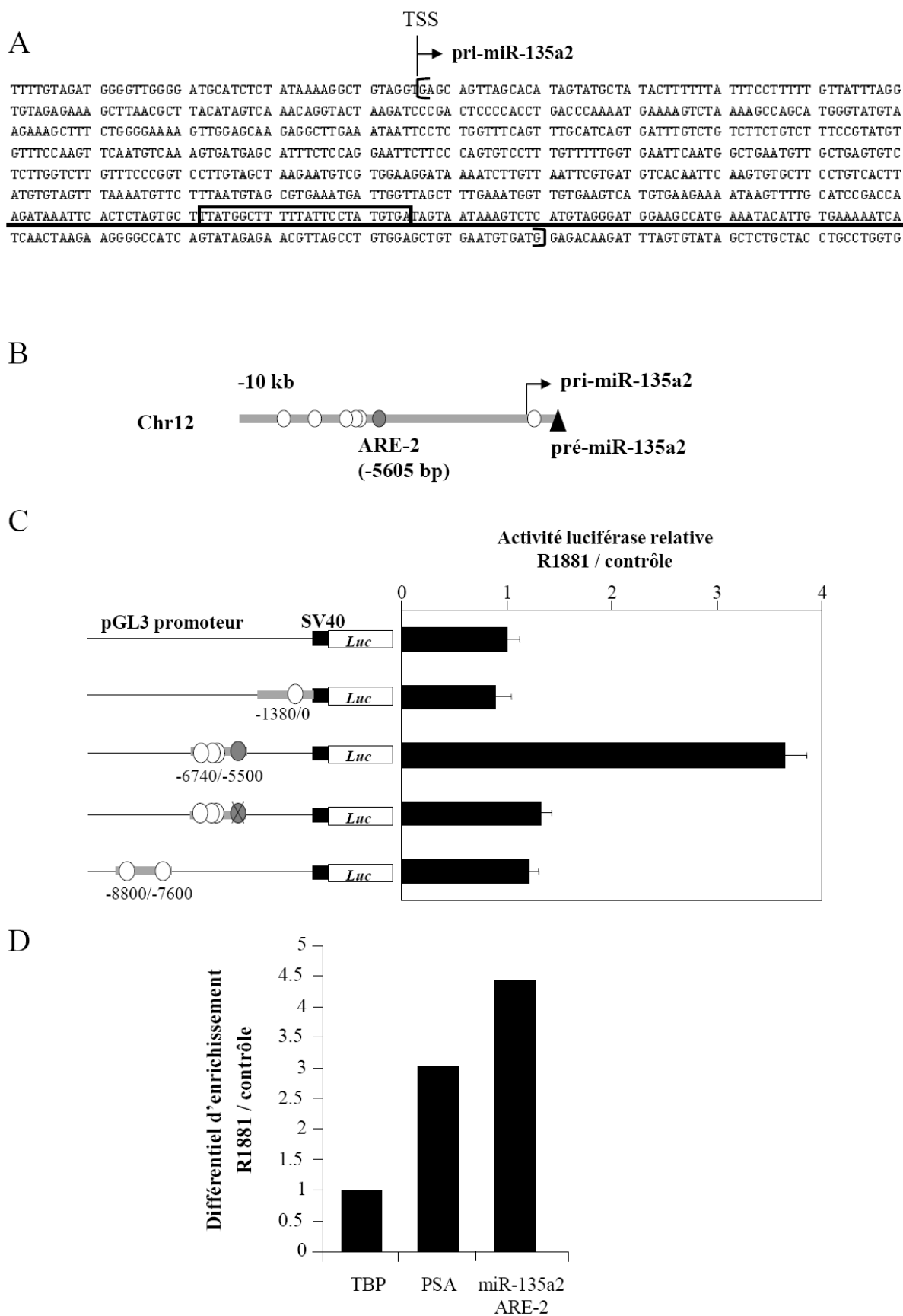


Figure 21 : Caractérisation des éléments de régulation transcriptionnelle dans le locus de miR-135a2.

A. Représentation schématique du gène *miR-135a2*. Le site de début de transcription (TSS), correspondant au début du pri-miR-135a2, a été identifié par 5'RACE et représenté par une flèche. Une séquence EST (Expressed Sequence Tags) qui a été trouvée par analyse BLAST et qui commence au niveau du TSS, est encadrée par deux crochets. Les séquences du pré-miR (soulignée) et du miARN mature (encadrée) ont été délimitées à l'aide des données de miRBase, sous le numéro d'accès MI0000453.

B. Localisation schématique des AREs identifiés par une étude *in silico*, dans les 10 kb en amont du pré-miR-135a2. L'ARE-2, représenté en gris, est l'ARE dont la séquence est la plus proche de la séquence ARE consensus.

C. Test rapporteur luciférase exprimant la réponse à la stimulation androgénique des AREs potentiels identifiés en amont du locus miR-135a2. Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec le plasmide pSG5-hAR, un vecteur pGL4.73 exprimant la luciférase Rénilla et un plasmide pGL3-promoter contenant les séquences des ARE potentiels clonées en amont du promoteur minimal SV40 conduisant l'expression de la luciférase Firefly. L'ARE-2 est représenté en gris. Une construction contient un ARE-2 mutant représenté par un cercle gris barré. Les cellules ont ensuite été traitées avec 1 nM de R1881 pendant 24 h, lysées et l'activité luciférase Firefly / Rénilla déterminée. Les résultats expriment l'activité luciférase dans les cellules traitées au R1881 comparée aux cellules non traitées.

D. Liaison de AR, déterminée par immuno-précipitation de chromatine (ChIP), dans la région contenant l'ARE-2 du gène *miR-135a2*, dans les cellules LNCaP traitées au R1881 comparées aux cellules non traitées. Les cellules LNCaP ont été traitées ou non pendant 24 h avec 1 nM de R1881 et des expériences de ChIP ont été réalisées à l'aide d'un anticorps anti-AR. Les ADN précipités ont servi de matrice pour des PCR quantitatives en temps réel. La liaison de AR dans la région promotrice du gène *TBP* sert de témoin négatif, alors que la liaison de AR dans la région enhancer du gène *PSA* sert de témoin positif.

II. Rôle fonctionnel de miR-135a

1. Expression de miR-135a

Pour déterminer si miR-135a est exprimé de façon ubiquitaire ou restreinte, nous avons analysé son profil d'expression par RT-PCRq, sur un large panel de tissus de souris mâles (données non présentées). L'expression de miR-135a a été détectée dans tous les tissus testés avec des taux différents ; elle est plus forte dans le cerveau, le cœur et les organes génitaux mâles (épididyme, vésicule séminale, canal déférent, testicule et prostate). Chez l'homme, un profil d'expression préférentiel a également été observé dans les tissus du tractus génital mâle (données non présentées).

Par hybridation *in situ*, sur des coupes de prostate humaine normale, nous avons pu observer l'expression de miR-135a dans les différents types cellulaires (**Figure 22**). A l'inverse du contrôle positif U6 dont l'expression est présente dans le noyau de toutes les cellules, l'expression de miR-135a est restreinte au cytoplasme des cellules épithéliales des glandes prostatiques. Aucune expression n'a été détectée dans le stroma musculaire.

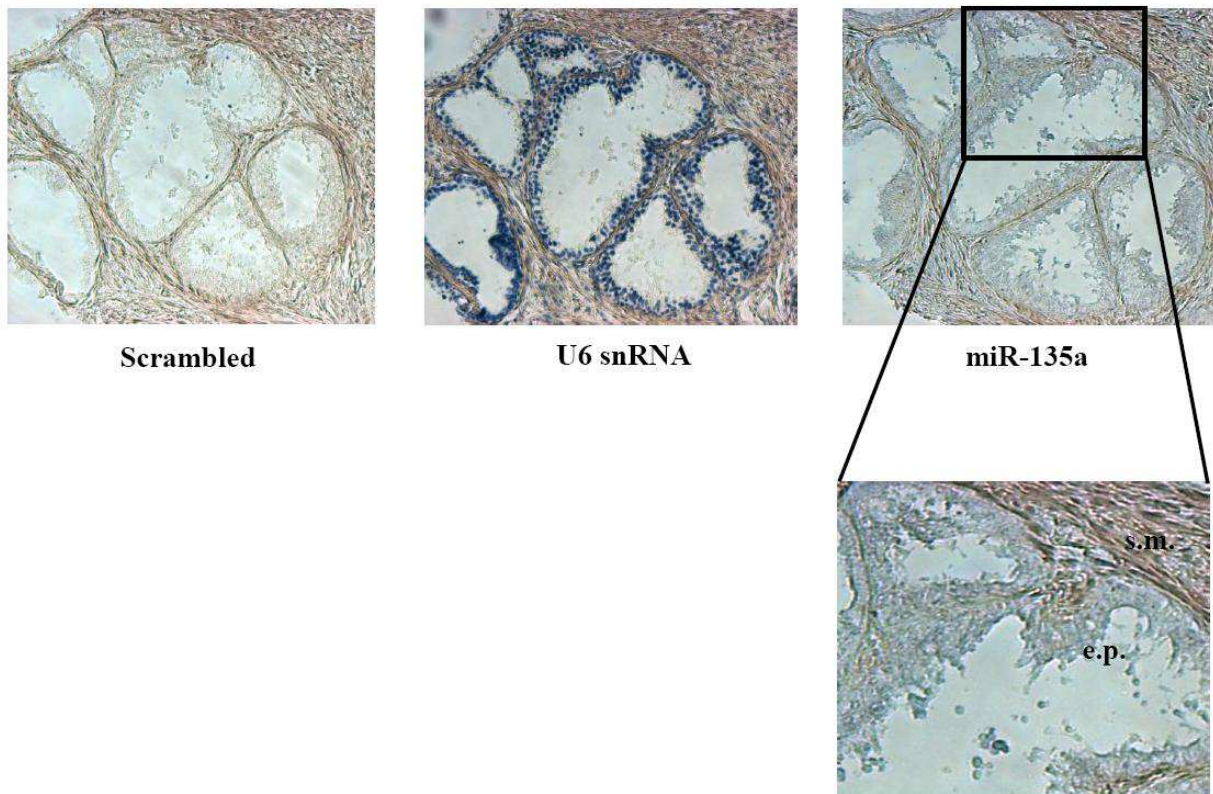


Figure 22 : Localisation de l'expression de miR-135a dans le tissu prostatique.

Images représentatives de la localisation de l'expression de miR-135a détectée par marquage d'hybridation *in situ* (HIS). Des coupes sériées de tissu prostatique humain inclus en paraffine ont été hybridées soit avec la sonde « contrôle négatif » (scrambled), soit avec la sonde « contrôle positif » (U6 snRNA), soit avec la sonde spécifique miR-135a. Le signal positif est donné par une coloration bleue NBT/BCIP, cytoplasmique ou nucléaire (pour la sonde miR-135a ou U6, respectivement). e.p. cellules épithéliales de glandes prostatiques ; s.m. stroma musculaire.

2. Identification des gènes cibles de miR-135a dans les cellules LNCaP

Afin d'explorer le rôle biologique de miR-135a dans les cellules prostatiques cancéreuses, nous avons recherché ses gènes cibles potentiels. A l'aide de puces pangénomiques, nous avons comparé, dans les cellules LNCaP, l'expression de gènes 24 h et 48 h après surexpression de miR-135a. En comparant les profils d'ARNm, (différentiel d'expression $\text{miR-135a} / \text{miR-NC} \leq -1,4$) nous avons identifié 174 gènes dont l'expression diminue dans les cellules LNCaP surexprimant miR-135a (**Tableau 3**).

Une analyse des motifs sur-représentés dans les 3'UTR de ces gènes, à l'aide du logiciel Amadeus, indique que le motif le plus présent est celui correspondant au site de fixation de miR-135a et miR-135b dont la séquence seed est identique (p-value $1,5 \times 10^{-35}$, **Figure 23**). Bien que la technique des puces pangénomiques ne permette d'identifier qu'une partie des gènes cibles de miR-135a, ceux pour lesquels miR-135a induit une diminution de l'expression de l'ARNm, cette analyse suggère que de nombreux gènes dérégulés ainsi identifiés sont des cibles potentielles de miR-135a.

Afin d'identifier les gènes cibles directs de miR-135a, nous avons recherché, à l'aide du logiciel TargetScan, les gènes ayant au moins un site potentiel de liaison de miR-135a dans la 3'UTR de leur ARNm. Parmi les 174 gènes sous-exprimés après surexpression de miR-135a, 87 gènes ont au moins un site potentiel de liaison pour miR-135a dans la 3'UTR et sont présentés en gras dans le **Tableau 3**.

Pour comprendre le rôle joué par miR-135a, *via* la régulation de l'expression de nombreux gènes, une analyse des processus biologiques sur-représentés, dans lesquels sont impliqués les gènes sous-exprimés, a été réalisée ; le but étant de mettre en évidence d'éventuels réseaux de gènes impliqués dans des fonctions spécifiques. Une analyse à l'aide du logiciel Ingenuity indique que les processus biologiques potentiellement dérégulés par une surexpression de miR-135a sont le cycle cellulaire, l'assemblage et l'organisation cellulaire, le mouvement cellulaire, la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN, la morphologie cellulaire, la mort et la survie cellulaire et enfin la croissance cellulaire et la prolifération (**Figure 24A**). Ces processus peuvent, lorsqu'ils sont dérégulés, contribuer à l'acquisition de nombreuses mutations, d'une prolifération incontrôlée et de la capacité à se déplacer, autant de caractéristiques impliquées dans l'initiation ou à la progression du cancer. La liste des gènes sous-exprimés après surexpression de miR-135a, dans chacun de ces

processus potentiellement dérégulés, est présentée dans la **Figure 24B** et les gènes en gras sont ceux dont la 3'UTR contient au moins un site de liaison potentiel pour miR-135a, d'après TargetScan.

RESULTATS

Gène	FC	Gène	FC	Gène	FC	Gène	FC
A_24_P101101	-1,60	F5	-1,46	MMS22L	-1,52	SGCB	-1,52
A_33_P3354296	-1,40	FAM111B	-1,89	MND1	-1,49	SHCBP1	-1,46
A_33_P3354728	-1,48	FAM174A	-1,61	MRPL16	-1,63	SLC25A32	-1,55
ACPP	-1,68	FAM72A	-1,40	MRPL42	-1,45	SLC25A5	-1,41
ADD3	-1,40	FAM72D	-1,66	MRT04	-1,56	SLC30A4	-1,56
AK027667	-1,43	FANCI	-1,47	MTFR2	-1,44	SLC31A2	-1,44
APOO	-1,40	FERMT2	-1,56	MTMR2	-1,43	SMC4	-1,59
ARG2	-1,49	FLJ45482	-1,41	MTMR9	-1,45	SPAG5	-1,44
ASPH	-1,83	FOX4	-1,82	MYBL1	-1,45	SPC25	-1,49
ASPM	-1,59	FOXN3	-1,40	NAP1L2	-1,52	SPDL1	-1,50
ATAD1	-1,40	G3BP1	-1,48	NCLN	-1,58	SSR1	-1,43
ATP2B4	-1,51	GABPB1-AS1	-1,43	NDC80	-1,43	SSR2	-1,54
BC011771	-1,57	GBE1	-1,49	NET1	-1,54	STAU2	-1,40
BCAP29	-1,53	GHR	-1,45	NPC1	-1,40	STK39	-1,63
BPNT1	-1,74	GMFB	-1,81	NUDT19	-1,55	STRADB	-1,60
BRCA1	-1,44	GMNN	-1,49	NUF2	-1,48	TAF9	-1,53
BUB1	-1,40	GPX8	-1,40	NUP153	-1,42	TBC1D4	-1,46
C11orf82	-1,74	H1F0	-1,50	OIP5	-1,41	TEX2	-1,45
C4orf46	-1,82	HAT1	-1,42	ORC5	-1,41	TEX30	-1,41
C7orf41	-1,46	HERC5	-1,40	ORC6	-1,48	TLDC1	-1,43
CCNA2	-1,40	HIRA	-1,72	OTUD6B	-1,61	TMED5	-1,63
CDCA8	-1,43	HJURP	-1,41	PANK3	-1,70	TMEM161B	-1,47
CDK1	-1,61	HOOK1	-1,47	PARBP	-1,44	TMEM189	-1,47
CDKN3	-1,48	HPS3	-1,40	PBK	-1,53	TMEM237	-1,44
CENPE	-1,65	IMMP1L	-1,43	PCYOX1L	-1,40	TMEM97	-1,45
CENPJ	-1,40	ITGB3BP	-1,43	PDCL	-1,42	TMTC3	-1,46
CENPK	-1,48	KATNAL1	-1,45	PDHX	-1,44	TMX4	-1,59
CENPQ	-1,43	KCNMA1	-1,85	PELI2	-1,48	TNFRSF10D	-1,41
CSNK1G3	-1,45	KCNS3	-1,49	PGAM1	-1,79	TNPO1	-1,46
CYB5R4	-1,49	KCTD10	-1,47	PGAM4	-1,46	TOP2A	-1,45
DENND6A	-1,58	KIAA0101	-1,81	PI4K2B	-1,42	TPX2	-1,40
DEPDC1	-1,73	KIF15	-1,52	PIGH	-1,70	TTK	-1,41
DTL	-1,52	KIF23	-1,70	POLQ	-1,51	TUG1	-1,57
E2F7	-1,44	KIF2C	-1,42	PRIM1	-1,48	UBE2C	-1,47
EAF2	-1,42	KIF4A	-1,45	PRKACB	-1,52	UBE2D4	-1,47
ECT2	-1,40	KNTC1	-1,45	PRMT6	-1,53	VLDLR	-1,43
EFCAB14	-1,40	LAMA1	-1,40	PRUNE2	-1,43	WDHD1	-1,56
EI24	-1,64	LANCL1	-1,53	PSIP1	-1,75	YWHAG	-1,48
EIF4EBP1	-1,48	LBR	-1,54	RACGAP1	-1,42	ZDHHC23	-1,61
ELOVL6	-1,40	LCP1	-1,55	RFC4	-1,41	ZNF143	-1,46
ENPP4	-1,41	LEPROTL1	-1,44	ROCK1	-1,52	ZNF652	-2,08
EPDR1	-1,54	MAP3K3	-1,40	RPL36AL	-1,40	ZWILCH	-1,50
ESCO2	-1,46	MELK	-1,56	SCML1	-1,95		
ESRRA	-1,40	MLF1IP	-1,55	SEC24D	-1,48		

Tableau 3 : Gènes cibles potentiels de miR-135a.

Gènes dont l'expression est statistiquement diminuée (différentiel d'expression miR-135a / miR-NC $\leq -1,4$), dans les puces pangénomiques réalisées dans les cellules LNCaP transfectées avec miR-135a mimic par rapport au miR-NC, pendant 24h et 48h. Le différentiel d'expression de chaque gène (FC) dans les cellules transfectées

avec miR-135a par rapport aux cellules transfectées avec miR-NC est indiqué. Les gènes en gras sont ceux identifiés par TargetScan comme ayant au moins un site de liaison potentiel de miR-135a dans leur 3'UTR et pouvant donc être des cibles directes de miR-135a.

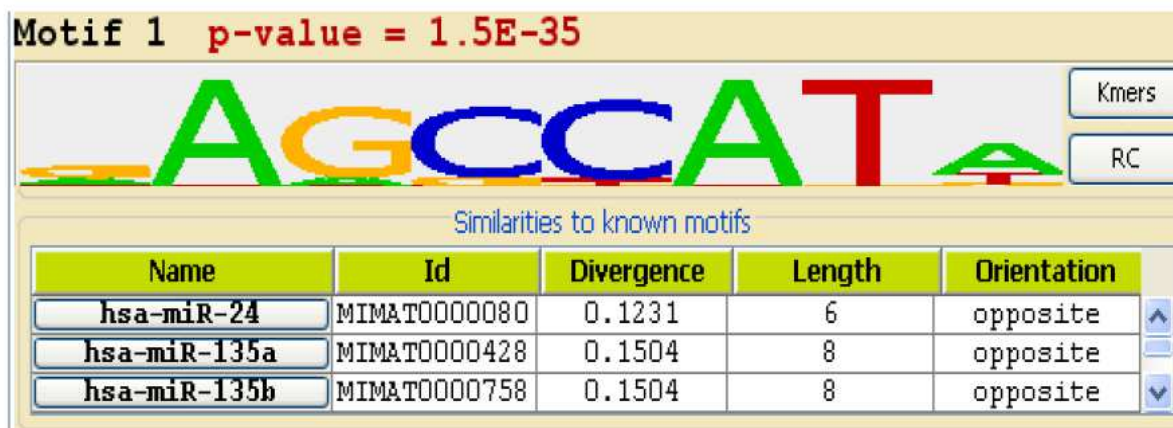


Figure 23 : Motif le plus représenté dans la 3'UTR des gènes sous-exprimés dans les cellules surexprimant miR-135a.

L'analyse *in silico* des séquences des gènes sous-exprimés après surexpression de miR-135a, avec le logiciel Amadeus, a révélé un site de liaison potentiel pour miR-135a et miR-135b statistiquement sur-représenté dans la 3'UTR de ces gènes.

RESULTATS

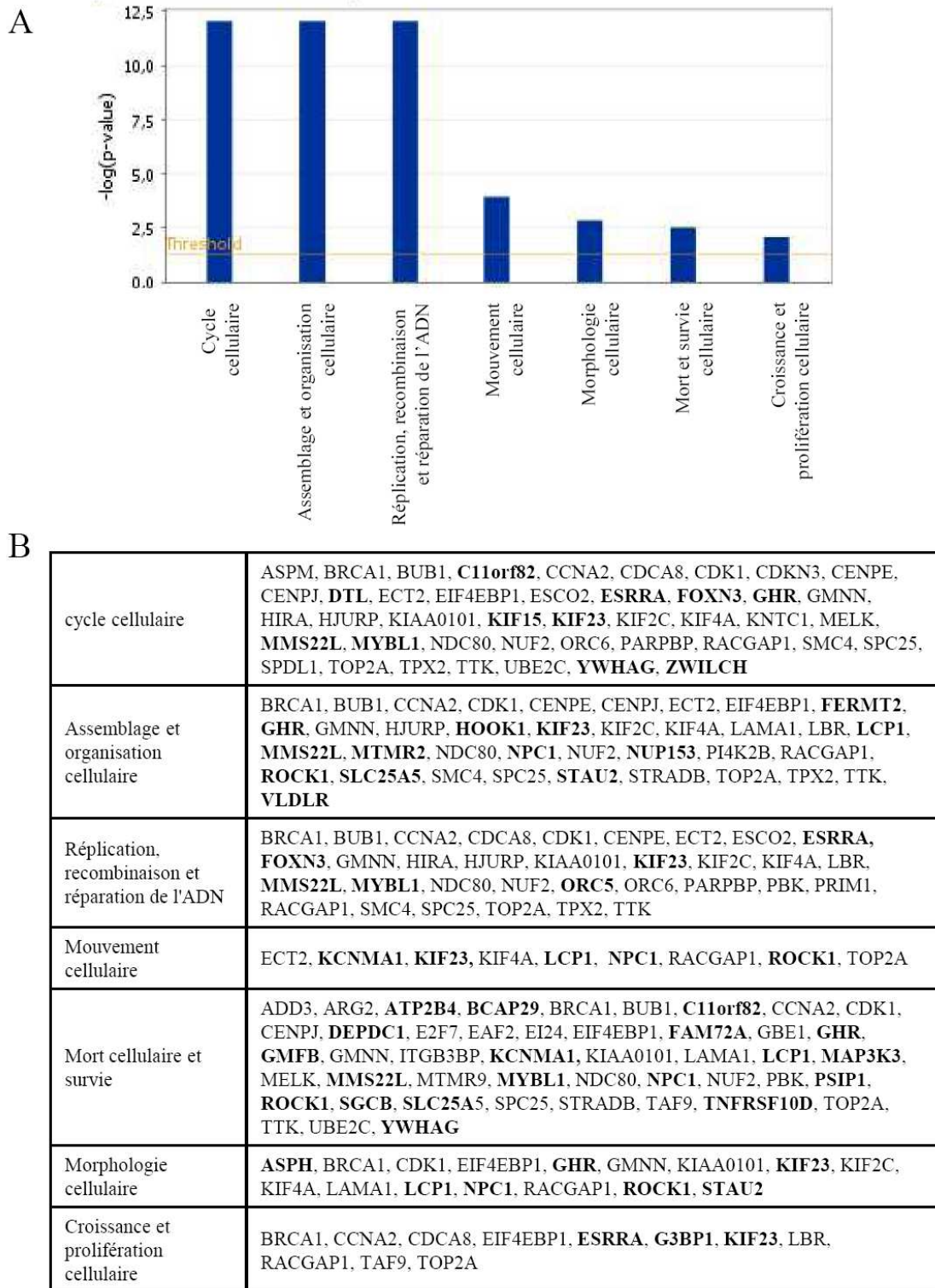


Figure 24 : Analyse des voies biologiques statistiquement sur-représentées dans lesquelles sont impliqués les gènes sous-exprimés dans les cellules surexprimant miR-135a.

L'étude des voies biologiques dans lesquelles sont impliqués les gènes sous-exprimés après surexpression de miR-135a a été réalisée avec le logiciel Ingenuity. Les voies les plus représentées sont indiquées dans l'histogramme (A) et les gènes impliqués dans ces processus sont présentés dans le panel B. Les gènes en gras représentent les gènes contenant un site potentiel de liaison de miR-135a dans leur 3'UTR.

3. Rôle de miR-135a dans les processus de prolifération, apoptose migration et invasion de cellules prostatiques tumorales

a- Rôle de miR-135a dans le cycle cellulaire, la survie, la mort, la migration et l'invasion des cellules PC-3

L'étude des gènes dérégulés par la surexpression de miR-135a, réalisée précédemment, indique que ce miARN peut être impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, ainsi que des processus de prolifération, survie, mort et migration cellulaires. Afin d'étudier la contribution de miR-135a dans ces différents processus, nous avons analysé l'effet d'une surexpression de miR-135a sur le comportement des cellules PC-3. Ces cellules ont été choisies car ce sont des cellules prostatiques tumorales dotées de capacités de migration et d'invasion.

Dans les cellules PC-3 surexprimant miR-135a, nous n'avons pas observé de changement dans la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, bien qu'une très légère diminution du pourcentage des cellules en phase G2-M soit observée, dans les cellules transfectées par miR-135a par rapport au miR-NC (**Figure 25A**). Une analyse spécifique du pourcentage des cellules en prolifération par marquage BrdU confirme que la surexpression de miR-135a ne modifie pas les capacités de prolifération des cellules PC-3 (**Figure 25B**).

L'analyse de la viabilité cellulaire par quantification de l'ATP cellulaire permettant de déterminer le nombre de cellules vivantes en culture, indique que miR-135a ne semble pas non plus être impliqué dans ce processus (**Figure 25C**). En effet, une surexpression de miR-135a ne modifie pas la répartition des cellules en culture entre cellules vivantes, en apoptose précoce, en apoptose tardive ou en nécrose, déterminée par un double marquage DIOC6-PI (**Figure 25D**). Plus précisément, les cellules PC-3 surexprimant miR-135a présentent une activité Caspase 3 identique à celle des cellules contrôles, démontrant que miR-135a ne régule pas les mécanismes induisant l'apoptose cellulaire (**Figure 25E**).

En revanche, les cellules PC-3 transfectées avec miR-135a présentent une diminution des capacités de migration par rapport aux cellules transfectées avec miR-NC (**Figure 25F**). En effet, à l'aide d'un test de comblement de blessure, analysé par vidéo-microscopie, on

observe que la surexpression de miR-135a entraîne une diminution de la vitesse de fermeture de la blessure.

La transfection de miR-135a induit également une diminution du nombre de cellules capables de traverser une couche de matrigel, indiquant que miR-135a inhibe les capacités d'invasion cellulaire (**Figure 25G**).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats indique que miR-135a joue principalement un rôle d'inhibition de la migration et de l'invasion dans les cellules PC-3.

RESULTATS

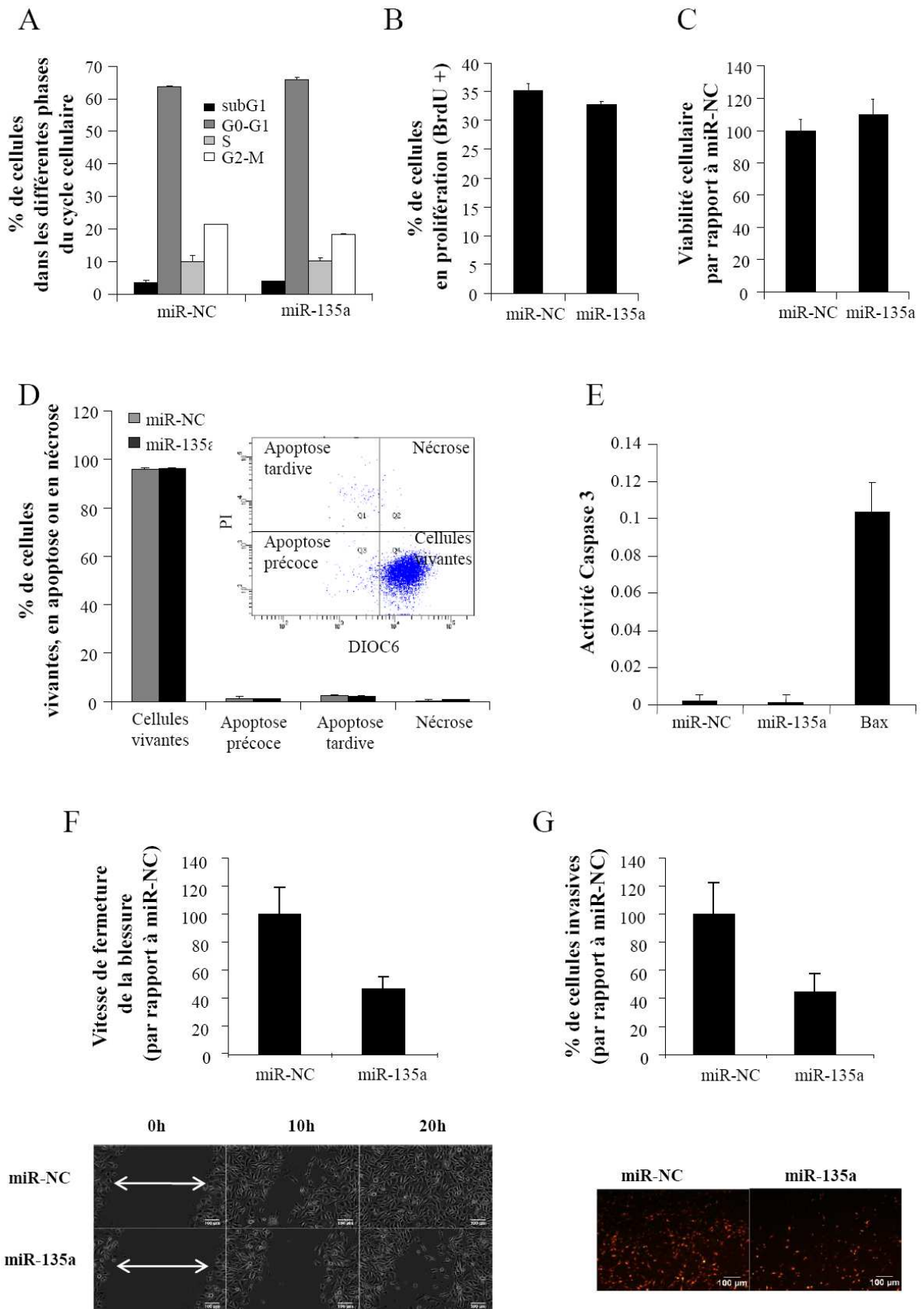


Figure 25 : Rôle de miR-135a dans différents processus biologiques.

RESULTATS

Les cellules PC-3 ont été transfectées avec miR-135a mimic ou le contrôle négatif miR-NC. Les données représentent la moyenne \pm écart-type de 3 expériences indépendantes.

A. Pourcentages de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire déterminés après marquage à l'Iodure de Propidium (PI) et analyse par cytométrie de flux.

B. Pourcentages de cellules en prolifération mesurés par l'incorporation de Bromodéoxyuridine (BrdU) dans l'ADN nouvellement synthétisé et analysés par cytométrie de flux.

C. Viabilité cellulaire mesurée par analyse au luminomètre de l'ATP cellulaire permettant de déterminer le nombre de cellules métaboliquement actives. La quantification de la viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage relatif par rapport à celle des cellules transfectées par le miR-NC.

D. Mesure de l'apoptose cellulaire par double marquage DIOC6-PI et analyse par cytométrie de flux.

E. Activité de la caspase 3 mesurée par analyse au fluorimètre du substrat DEVD-AFC clivé par la caspase 3. La transfection de Bax est utilisée comme contrôle positif d'apoptose cellulaire.

F. Analyse par vidéo-microscopie de la migration cellulaire par un test de comblement de blessure. La quantification de la vitesse de fermeture de blessure est exprimée en pourcentage relatif par rapport à celle des cellules transfectées par le miR-NC. Des images représentatives de fermeture de la blessure sont présentées à 0 h, 10 h et 20 h (barre = 100 μ m).

G. Invasion cellulaire. Le pourcentage des cellules invasives a été déterminé par (nombre de cellules passant la membrane recouverte de Matrigel / nombre de cellules ayant migré à travers la membrane) \times 100. La quantification des cellules invasives est exprimée en pourcentage relatif par rapport à celle des cellules transfectées par le miR-NC. Des images représentatives des cellules, marquées au DiI, ayant traversé l'insert recouvert de Matrigel sont présentées (barre = 100 μ m).

b- miR-135a cible les ARNm de ROCK1 et ROCK2

Parmi les gènes sous-exprimés dans les cellules transfectées avec miR-135a, impliqués dans les processus de mouvement cellulaire et ayant un site de liaison potentiel de miR-135a, nous avons retenu ROCK1. Cette protéine kinase, appartenant à la voie de signalisation de Rho, est impliquée dans les processus d'organisation du cytosquelette, de migration et d'invasion cellulaire. De plus, le second membre de la famille des ROCKs, ROCK2, dont la séquence et la fonction sont très proches de celles de ROCK1, est également prédit pour être une cible de miR-135a, selon TargetScan. Nous avons donc décidé d'évaluer le rôle de miR-135a sur l'expression et la fonction de ROCK1 et ROCK2.

Nous avons confirmé l'effet de la surexpression de miR-135a sur la régulation de l'expression de ROCK1 et ROCK2, au niveau transcriptionnel et protéique par des analyses de RT-PCRq et Western Blot, respectivement. Les cellules LNCaP transfectées pendant 48 h avec miR-135a présentent une diminution d'environ 50% du taux d'ARNm de ROCK1 et ROCK2, par rapport aux cellules transfectées avec le contrôle négatif miR-NC (**Figure 26A**). De plus, une forte diminution du taux de protéines ROCK1 et ROCK2 (de 96% et 80% respectivement, **Figure 26B**) a été observée, 48 h après la transfection de miR-135a.

Nous avons ensuite étudié l'interaction directe entre miR-135a et les ARNm cibles potentiels de ROCK1 et ROCK2. Nous avons généré des plasmides contenant une partie de la 3'UTR de ROCK1 ou ROCK2 en aval d'un gène luciférase (wt 3'UTR) et des plasmides avec des délétions des séquences reconnues par miR-135a (mut 3'UTR) (**Figure 26C**). Lorsque les constructions sauvages (wt) sont cotransfectées avec miR-135a dans les cellules HeLa, on observe une diminution de l'activité luciférase, par rapport au vecteur vide (-57% et -32% pour les constructions ROCK1 et ROCK2 respectivement; **Figure 26D**). A l'inverse, l'expression luciférase des constructions mutantes (mut 3'UTR) n'a pas été affectée par la surexpression de miR-135a. Ces données révèlent une interaction directe entre miR-135a et la 3'UTR des ARNm de ROCK1 et ROCK2.

L'ensemble de ces résultats indique donc que miR-135a régule négativement l'expression de ROCK1 et ROCK2 et que les ARNm de ROCK1 et ROCK2 sont des cibles directes de miR-135a

Dans les cellules LNCaP traitées au R1881, dans lesquelles l'expression de miR-135a est augmentée, nous avons également observé une diminution des quantités protéiques de ROCK1 et ROCK2 (-74% et -65%, respectivement; **Figure 26E**), suggérant que les androgènes régulent négativement l'expression de ces deux protéines à travers la surexpression de miR-135a.

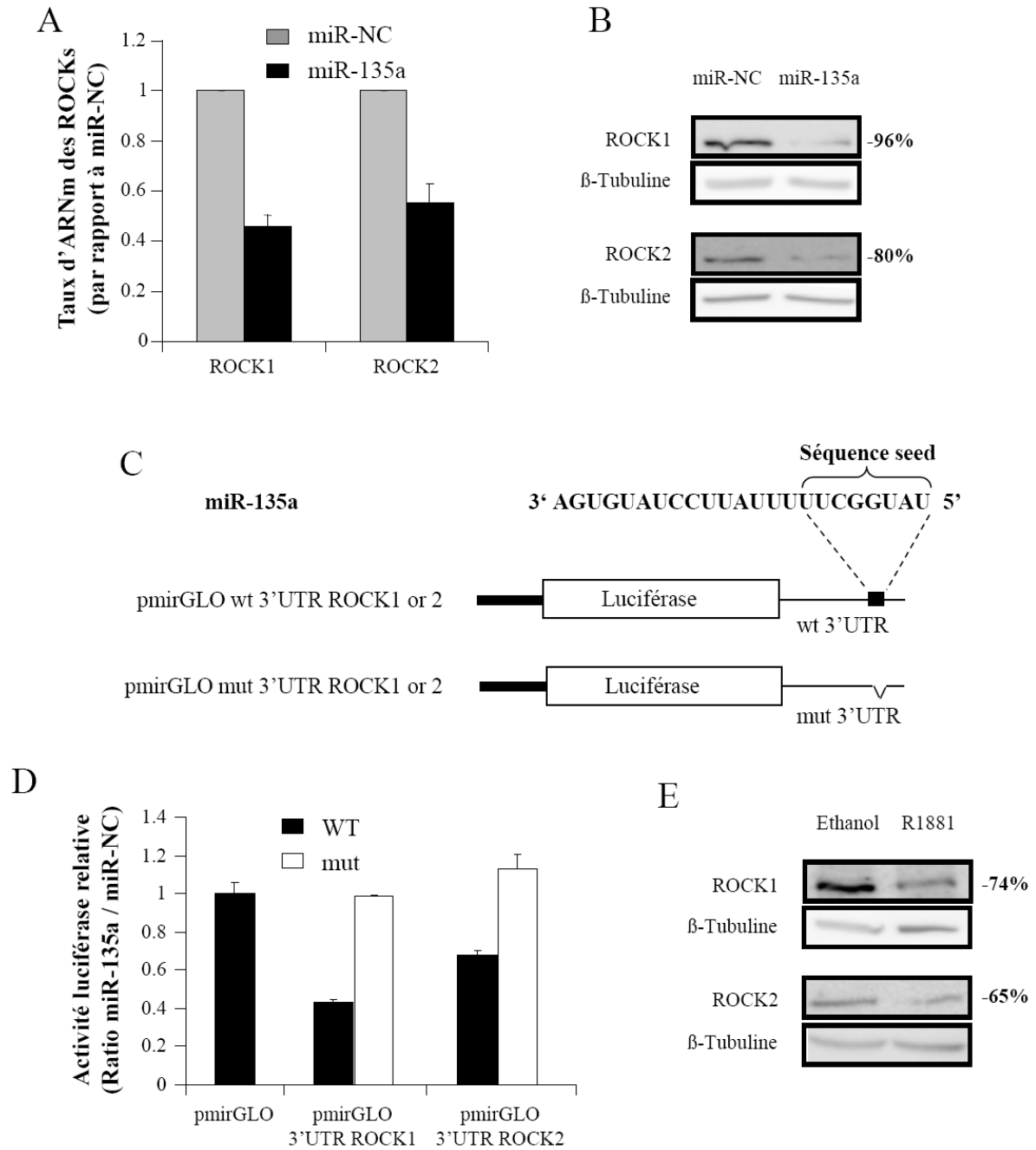


Figure 26 : miR-135a régule l'expression de ROCK1 et ROCK2 en interagissant avec leur 3'UTR.

A. Expression des ARNm de ROCK1 et ROCK2 dans les cellules LNCaP, 48 h après la transfection de miR-135a mimic ou du contrôle négatif miR-NC, déterminée par RT-PCRq. Les données sont présentées sous forme de différentiel d'expression de ces gènes dans les cellules transfectées avec miR-135a, comparées aux cellules transfectées avec miR-NC. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

B. Analyse par Western Blot de l'expression des protéines ROCK1 et ROCK2 dans les cellules LNCaP, 48 h après transfection de miR-135a mimic ou du contrôle négatif miR-NC. L'expression protéique a été quantifiée avec le logiciel MultiGauge et normalisée par rapport à l'expression de la β -Tubuline et les pourcentages de diminution (miR-135a/miR-NC, sur la droite) ont été calculés.

C. Représentation schématique des constructions de plasmide contenant la 3'UTR de ROCK1 ou ROCK2. Les sites de liaison potentiels de miR-135a identifiés par TargetScan, sont représentés par un carré noir (WT) et les mutants (mut) correspondent à des délétions de la région complémentaire à la séquence seed de miR-135a.

D. Interaction de miR-135a avec les 3'UTR de ROCK1 et ROCK2 analysée par des tests rapporteurs luciférase. Des vecteurs pmiRGLO contenant les 3'UTR de ROCK1 ou ROCK2, sauvages (WT) ou mutées (mut) pour les sites de liaison de miR-135a, sont transfectés dans les cellules HeLa avec miR-135a ou miR-NC. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection et les résultats sont présentés comme le différentiel de l'activité luciférase dans les cellules transfectées par miR-135a/miR-NC. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

E. Analyse par Western Blot de l'expression protéique de ROCK1 et ROCK2 dans les cellules LNCaP, 48h après traitement androgénique (R1881) ou après le contrôle négatif à l'éthanol (Eth). Les taux d'expression protéiques ont été quantifiés avec le logiciel MultiGauge et normalisés par rapport à ceux de la β -Tubuline. Les pourcentages de diminution correspondent aux taux normalisés de protéines dans les cellules traitées au R1881/Eth.

c- miR-135a inhibe la migration et l'invasion cellulaire en régulant l'expression des ROCKs.

Comme indiqué précédemment dans la **Figure 25F**, la transfection de miR-135a dans les cellules PC-3 induit un retard de migration des cellules en culture lors d'un test de comblement de blessure. En parallèle, nous avons artificiellement diminué l'expression des protéines ROCK1 et ROCK2 en co-transfectant siROCK1 et siROCK2, ou en traitant les cellules avec un inhibiteur chimique des kinases ROCKs, Y-27632. Ces différents traitements induisent également une inhibition de la migration cellulaire (**Figure 27A**), suggérant le rôle de ROCK1 et ROCK2 dans l'inhibition de la migration par miR-135a. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réintroduit ROCK1 dans les cellules PC-3 surexprimant miR-135a. Ces cellules retrouvent les capacités de migration similaires aux cellules contrôles (**Figure 27A**).

L'étude de la morphologie des cellules en migration a confirmé cette hypothèse. Les cellules transfectées avec miR-135a sont plus allongées que les cellules PC-3 transfectées avec miR-NC, et sont dotées de multiples protrusions (**Figure 27B**), un phénotype proche de celui des cellules transfectées avec les siROCK1/siROCK2 ou traitées avec Y-27632. De façon intéressante, en forçant l'expression exogène de ROCK1 dans les cellules surexprimant miR-135a, on restaure le phénotype cellulaire normal, ce qui suggère un rôle collaboratif de ROCK1 et ROCK2 dans la morphologie et la migration cellulaire.

Enfin, une observation du cytosquelette d'actine par marquage des cellules à la phalloïdine couplée au TRITC (Tetramethylrhodamine B isothiocyanate), en immunofluorescence, appuie de telles observations morphologiques. En effet, dans les cellules transfectées avec miR-135a, on observe plus de cellules allongées que dans les cellules transfectées avec le contrôle négatif (miR-NC), et ceci à faible ou à forte densité cellulaire (**Figure 27C**).

L'ensemble de ces résultats suggère fortement l'implication des protéines ROCKs, régulateurs du cytosquelette d'actine, dans le rôle de miR-135a sur la migration des cellules prostatiques tumorales.

Nous avons ensuite analysé la contribution des protéines ROCKs dans l'inhibition de l'invasion cellulaire par miR-135a. Comme présenté dans la **Figure 28**, la surexpression de miR-135a, tout comme la transfection de siROCK1, siROCK2 ou le traitement au Y-27632,

diminue fortement l'invasion des cellules PC-3. De plus, comme pour la migration cellulaire, la surexpression de ROCK1 exogène dans les cellules transfectées avec miR-135a, abolit l'inhibition de l'invasion cellulaire.

L'ensemble de ces résultats indique que miR-135a régule négativement la migration et l'invasion cellulaire, en ciblant les ARNm de ROCK1 et ROCK2. L'effet de miR-135a ne semble pas être spécifique de la prostate puisque nous avons observé des résultats similaires dans des cellules HeLa (données non présentées).

RESULTATS

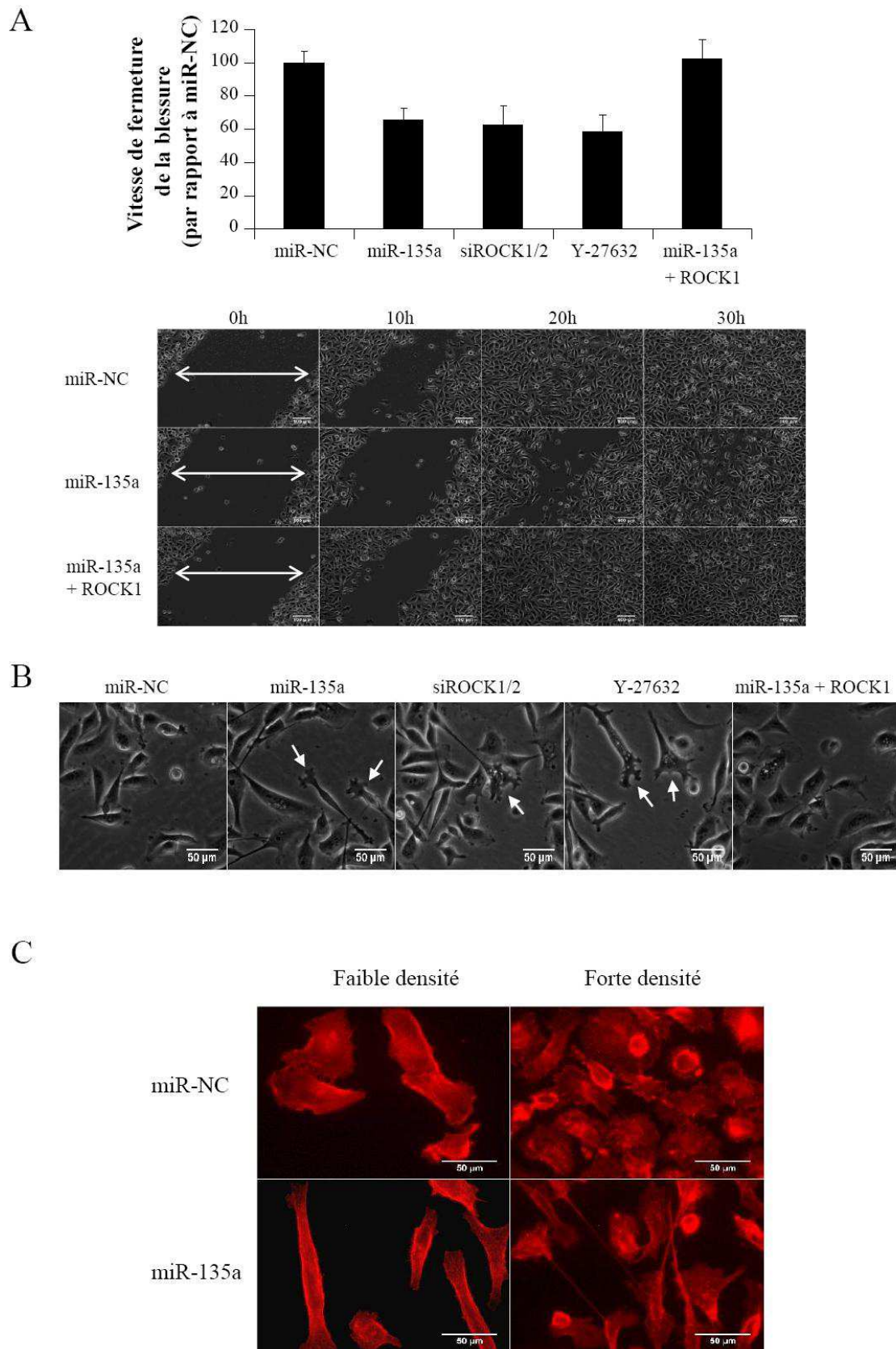


Figure 27 : miR-135a diminue les capacités de migration des cellules PC-3, *via* la voie de signalisation des ROCKs.

RESULTATS

A. Analyse par vidéo-microscopie de la migration des cellules PC-3, soit transfectées avec le contrôle négatif (miR-NC), miR-135a, siROCK1 et siROCK2 (siROCK1/2) ou miR-135a et l'ADNc de ROCK1, soit traitées avec le Y-27632, lors d'un test de comblement de blessure. La quantification de la vitesse de fermeture de blessure est exprimée en pourcentage relatif dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles. Des images représentatives de certaines conditions sont présentées (barre = 100 μ m)

B. Morphologie des cellules en migration dans les conditions décrites en A. Barre = 50 μ m.

C. Observation du cytosquelette d'actine de cellules PC-3 transfectées avec miR-NC ou miR-135a mimic. Les cellules ont été ensemencées à une densité cellulaire faible ($0,5 \cdot 10^5$ /puits) ou forte ($2 \cdot 10^5$ /puits) et transfectées pendant 48h. L'actine cellulaire a été marquée à la Phalloïdine couplée au TRITC. Des images représentatives de chaque condition sont présentées (barre = 50 μ m)

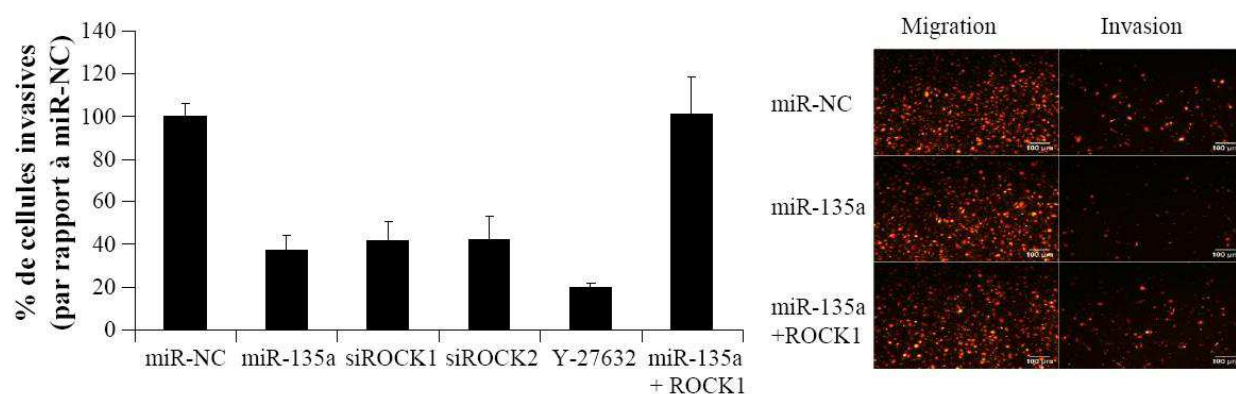


Figure 28 : miR-135a diminue les capacités d'invasion des cellules PC-3, via la voie de signalisation des ROCKs.

Test d'invasion cellulaire des cellules PC-3, soit transfectées avec le contrôle négatif (miR-NC), miR-135a, siROCK1, siROCK2 ou miR-135a et l'ADNc de ROCK1 soit traitées avec le Y-27632. Le pourcentage de cellules invasives a été déterminé par : (nombre de cellules traversant la membrane recouverte de Matrigel / nombre de cellules traversant la membrane seule) x 100. Des images représentatives de certaines conditions sont présentées (barre = 100 μ m)

4. Rôle de miR-135a dans la signalisation androgénique

a- **miR-135a cible directement les ARNm de ESRRA et FOXN3 dans les cellules LNCaP**

L'étude bibliographique du rôle des gènes cibles potentiels de miR-135a (**Tableau 3**) nous a permis d'identifier deux gènes, ESRRA et FOXN3, potentiellement impliqués dans la signalisation androgénique. Le gène ESRRA ($ERR\alpha$) code pour un récepteur nucléaire orphelin, capable d'interagir avec la voie de signalisation de AR en se fixant sur des AREs, en absence d'androgènes, et d'activer la transcription de gènes cibles de AR, dont le PSA (Teyssier *et al.*, 2008). Le rôle de FOXN3 est beaucoup moins clair, mais ce gène appartient à la famille des facteurs FOX (Forkhead Box). FOXA1, un membre de cette famille, joue un rôle de facteur pionnier et favorise le recrutement de cofacteurs et/ou facilite la liaison de AR à l'ADN (Gao *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011a). De plus, ces deux gènes sont impliqués dans les voies biologiques du cycle cellulaire et de la réplication, recombinaison et réparation de l'ADN (**Figure 24B**).

Nous avons, dans un premier temps, confirmé l'effet de la surexpression de miR-135a sur la régulation de l'expression de ESRRA et FOXN3, au niveau transcriptionnel et protéique par des analyses de RT-PCRq et Western Blot, respectivement. Une surexpression de miR-135a, par transfection de miR-135a mimic dans les cellules LNCaP, induit une diminution du taux d'ARNm de ESRRA et FOXN3 de presque 50%, par rapport aux cellules transfectées avec le contrôle négatif miR-NC (**Figure 29A**) et une diminution drastique du taux de protéine, de 65% et 96% respectivement (**Figure 29B**).

Nous avons ensuite étudié l'interaction directe entre miR-135a et les ARNm cibles potentiels de ESRRA et FOXN3. Les ARNm de ESRRA et FOXN3 ont, tous les deux, deux sites potentiels de liaison de miR-135a dans leur 3'UTR, selon TargetScan. Nous avons générés des plasmides contenant une partie de la 3'UTR de ESRRA ou FOXN3, dont les deux sites potentiels de liaison de miR-135a, en aval d'un gène luciférase (3'UTR wt) et des plasmides avec des délétions pour les séquences reconnues par miR-135a (mut 3'UTR) (**Figure 29C**). Lorsque les constructions contenant les 3'UTR wt sont cotransfectées avec miR-135a mimic dans les cellules HeLa, on observe une diminution de l'activité luciférase (-53% et -81% pour les constructions ESRRA et FOXN3 respectivement; **Figure 29D**). A

l'inverse, l'expression luciférase des constructions mutantes (mut 3'UTR) n'a pas été affectée par la surexpression de miR-135a. Ces données révèlent une interaction directe entre miR-135a et la 3'UTR des ARNm de ESRRA et FOXN3.

L'ensemble de ces résultats indique donc que miR-135a régule négativement l'expression de ESRRA et FOXN3 et que les ARNm de ESRRA et FOXN3 sont des cibles directes de miR-135a.

Dans les cellules LNCaP traitées au R1881, dans lesquelles l'expression de miR-135a est augmentée, l'expression protéique de FOXN3 diminue de 60%. Cependant, ce n'est pas le cas de celle d'ESRRA, qui n'est pas altérée par les androgènes (**Figure 29E**). L'augmentation de l'expression de miR-135a par la stimulation androgénique semble corrélée à la diminution de FOXN3, suggérant que les androgènes régulent négativement l'expression de FOXN3 à travers la surexpression de miR-135a. D'un autre côté, l'expression de ESRRA n'étant pas diminuée dans des cellules stimulées, alors que l'expression de miR-135a est augmentée, il semblerait que ESRRA soit soumis à d'autres régulations (androgéniques) pouvant certainement contre-balancer les effets de miR-135a.

L'ensemble de ces données indique donc que miR-135a cible et régule négativement l'expression de FOXN3 et ESRRA. Cependant, d'autres mécanismes entrant en jeu dans la régulation androgénique de ESRRA, il sera difficile d'identifier son rôle dans la voie de signalisation AR/miR-135a. A la suite de ces résultats, nous nous sommes focalisés sur FOXN3, une protéine de la famille des FOX dont la fonction a été très peu étudiée.

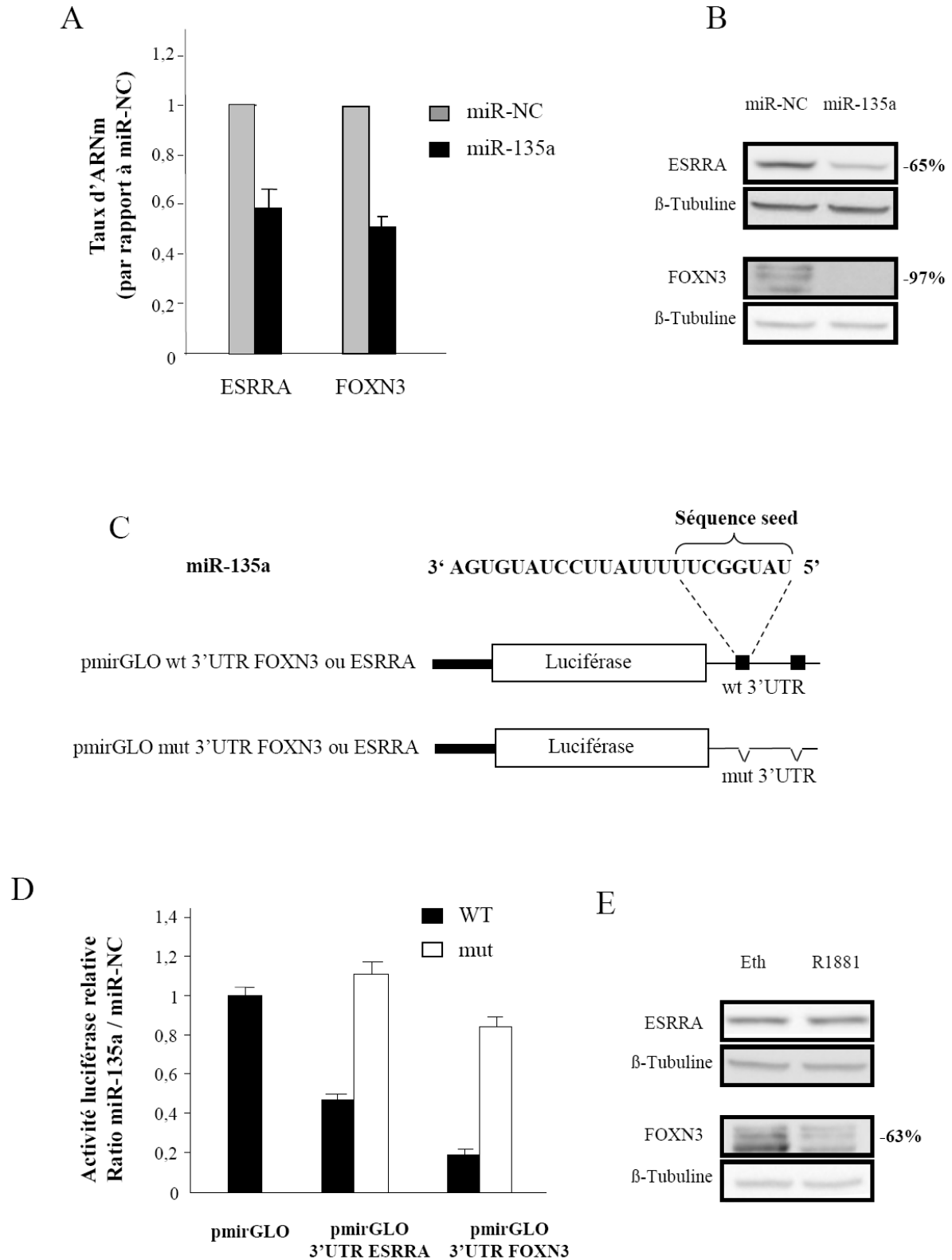


Figure 29 : miR-135a régule l'expression de ESRRA et FOXN3 en interagissant avec leur 3'UTR.

A. Expression des ARNm de ESRRA et FOXN3 dans les cellules LNCaP, 48 h après la transfection de miR-135a mimic ou du contrôle négatif miR-NC et déterminée par RT-PCRq. Les données sont représentées comme

le différentiel d'expression des cellules transfectées par miR-135a comparées aux cellules transfectées avec miR-NC. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

B. Analyse par Western Blot de l'expression des protéines ESRRA et FOXN3 dans les cellules LNCaP, 48 h après transfection de miR-135a mimic ou du contrôle négatif miR-NC. L'expression protéique a été quantifiée avec le logiciel MultiGauge et normalisée par rapport à l'expression de la β -Tubuline et les pourcentages de diminution (miR-135a/miR-NC, sur la droite) ont été calculés.

C. Représentation schématique des constructions de plasmide contenant la 3'UTR de ESRRA ou FOXN3. Les sites de liaison potentiels de miR-135a identifiés par TargetScan, sont représentés par un carré noir (WT) et les mutants (mut) correspondent à des délétions de la région complémentaire à la séquence seed de miR-135a.

D. Interaction de miR-135a avec les 3'UTR de ESRRA et FOXN3 analysée par des tests rapporteurs luciférase. Des vecteurs pmiRGLO contenant les 3'UTR de ESRRA ou FOXN3, sauvages (WT) ou mutées (mut) pour les sites de liaison de miR-135a, sont transfectés dans les cellules HeLa avec miR-135a ou miR-NC. L'activité luciférase a été mesurée 48h après transfection et les résultats sont présentés comme le différentiel de l'activité luciférase dans les cellules transfectées par miR-135a/miR-NC. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

E. Analyse par Western Blot de l'expression protéique de ESRRA et FOXN3 dans les cellules LNCaP, 48h après traitement androgénique (R1881) ou après le contrôle négatif à l'éthanol (Eth). Les taux d'expression protéiques ont été quantifiés avec le logiciel MultiGauge et normalisés par rapport à ceux de la β -Tubuline. Les pourcentages de diminution correspondent aux taux normalisés de protéines dans les cellules traitées au R1881/Eth.

b- FOXN3 augmente l'activité transcriptionnelle de AR

Afin d'évaluer le rôle de FOXN3 dans l'activité transcriptionnelle de AR, nous avons utilisé un vecteur rapporteur où la transcription de la luciférase est placée sous régulation androgénique (**Figure 30A**). La transcription de ce gène luciférase, et par conséquent son activité, est augmentée en présence de AR et d'androgènes. Le rôle de FOXN3 dans la régulation transcriptionnelle de AR a donc été analysé par cotransfection d'un vecteur d'expression FOXN3 et du vecteur rapporteur.

L'activité luciférase relative correspond à l'activité luciférase dans les cellules stimulées par rapport aux cellules contrôles. Le différentiel d'induction des cellules transfectées avec un vecteur d'expression FOXN3 a été calculé par rapport à celui des cellules transfectées avec un vecteur vide. Comme présenté dans la **Figure 30B**, une surexpression de FOXN3 entraîne une augmentation de l'activité luciférase, sous traitement androgénique (**Figure 30B**). Cette augmentation est d'autant plus importante que la quantité de vecteur d'expression FOXN3 ajoutée est grande et peut ainsi atteindre un taux d'induction six fois plus élevé que celle normalement induite par AR seul.

Ces résultats indiquent que FOXN3 augmente l'activité transcriptionnelle de AR.

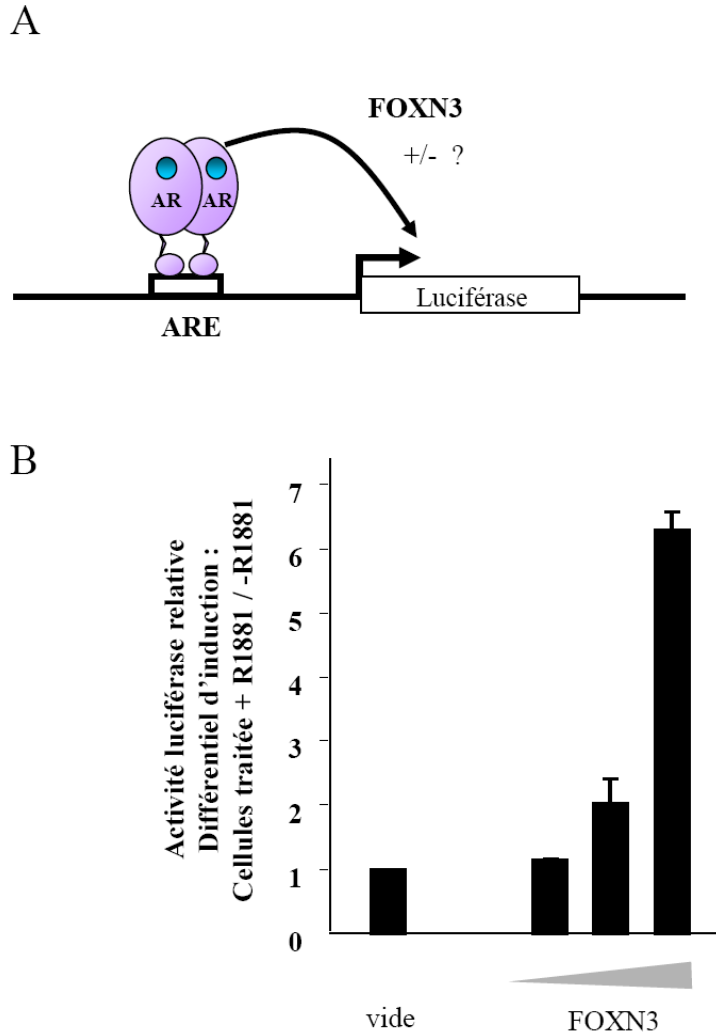


Figure 30 : FOXN3 augmente l'activité transcriptionnelle de AR.

A. Schéma de la construction utilisée pour analyser l'influence de FOXN3 sur l'activité transcriptionnelle de AR. Un vecteur pGL3-promoteur contenant 3 AREs de la Probasine en amont du gène de la luciférase, permet aux cellules d'activer la transcription de ce gène en présence de AR et d'androgènes. La surexpression de FOXN3 peut-elle influencer (positivement ou négativement) l'activité transcriptionnelle de AR ?

B. Effet de la surexpression de FOXN3 sur l'activité transcriptionnelle de AR analysée par un test rapporteur luciférase. Les cellules HeLa ont été cotransfectées avec pSG5-hAR, un vecteur rapporteur luciférase Firefly dont la transcription est placée sous le contrôle de 3AREs du gène Probasin, le plasmide pGL4.73 exprimant la Rénilla luciférase pour normaliser l'efficacité de transfection et le vecteur pcDNA3.1(+) vide ou contenant l'ORF de FOXN3 (100, 200 ou 400 ng). Les cellules ont été traitées avec 1 nM de R1881 ou avec un contrôle négatif et présentées comme la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes. Les données sont représentées comme le différentiel d'activité luciférase dans les cellules traitées au R1881/contrôle. Le différentiel d'induction des cellules transfectées avec un vecteur d'expression FOXN3 a été calculé par rapport à celui des cellules transfectées avec un vecteur vide.

c- Rôle fonctionnel de FOXN3 dans les cellules LNCaP

Aucune étude n'a, jusqu'à présent, rapporté un rôle fonctionnel de FOXN3 dans les cellules prostatiques tumorales. Cependant, FOXN3 semble associé aux points de contrôle du cycle cellulaire et à la réparation de l'ADN.

Etant donné que les androgènes contrôlent la prolifération des cellules prostatiques androgéno-sensibles LNCaP et que FOXN3 augmente l'activité transcriptionnelle de AR, nous avons analysé le rôle de FOXN3 sur la prolifération cellulaire dépendante des androgènes. Pour cela, nous avons transfecté dans des cellules LNCaP, soumises ou non à une stimulation androgénique, un siARN anti-FOXN3 (siFOXN3).

Comme attendu, lorsqu'on stimule les cellules LNCaP au R1881, après privation androgénique, on observe une augmentation de la prolifération des cellules de 80% (**Figure 31**). Cependant, quand on traite les cellules avec un siFOXN3, 48 h avant la stimulation androgénique, l'augmentation de la prolifération cellulaire induite par les androgènes n'est pas aussi importante (60%).

Il semblerait donc que FOXN3 soit impliqué dans la prolifération des cellules prostatique dépendante des androgènes.

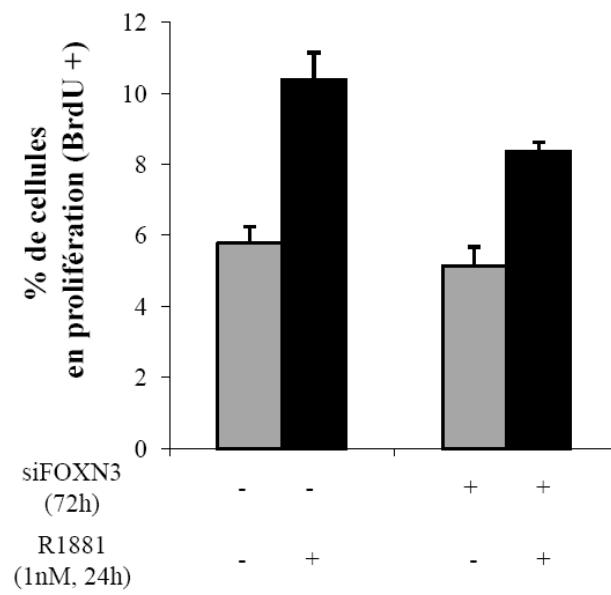


Figure 31 : Rôle fonctionnel de FOXN3 dans les cellules LNCaP.

Pourcentages de cellules en prolifération mesurés par l'incorporation de BrdU et analyse par cytométrie de flux. Les cellules LNCaP ont été transfectées, avec siFOXN3 ou siNT, pendant 48h dans le milieu de privation en androgènes, avant d'être stimulées pendant 24 h.

d- FOXN3 diminue la migration cellulaire des cellules PC-3

FOXN3 est un gène cible de miR-135a, dont le rôle fonctionnel principal, que nous avons mis en évidence, est d'inhiber la migration et l'invasion des cellules prostatiques tumorales. Afin d'évaluer si FOXN3 contribue à l'effet inhibiteur de miR-135a sur la migration cellulaire, nous avons artificiellement diminué l'expression de la protéine FOXN3 en transfectant du siFOXN3 dans les cellules PC-3.

Par un test de comblement de blessure, nous avons observé qu'une inhibition de l'expression de FOXN3 induit une diminution de la vitesse de fermeture de la blessure (**Figure 32**) ; un effet similaire à celui que nous avons observé après surexpression de miR-135a.

Ces résultats indiquent que FOXN3 est impliqué dans la migration cellulaire. Il pourrait alors participer au rôle d'inhibition de la migration par miR-135a.

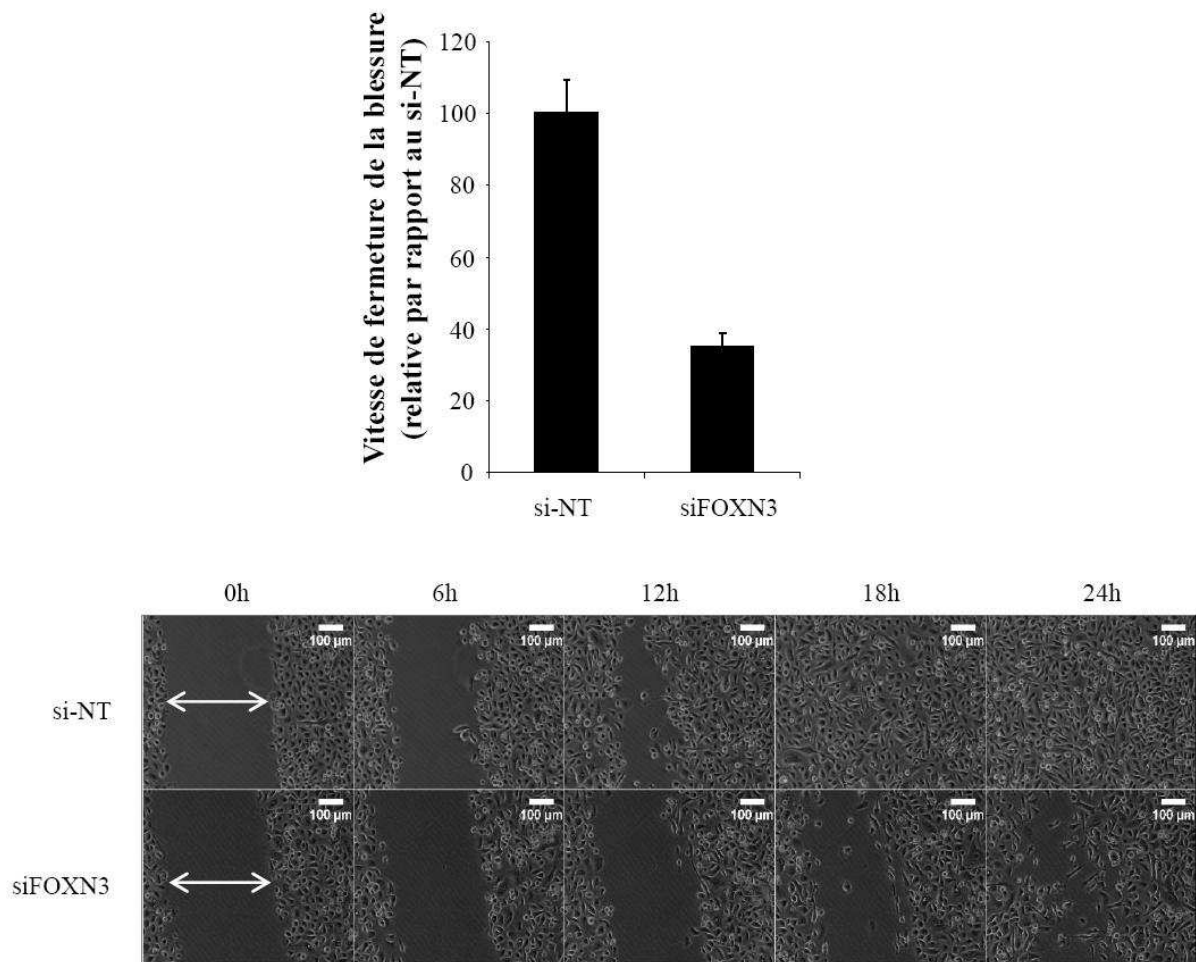


Figure 32 : FOXN3 diminue la migration des cellules PC-3.

Analyse par vidéo-microscopie de la migration cellulaire par un test de comblement de blessure. La quantification de la vitesse de fermeture de blessure est exprimée en pourcentage relative par rapport à celle des cellules transfectées par miR-NC. Des images représentatives de la blessure des cellules PC-3 transfectées avec un contrôle négatif (si-NT) ou siFOXN3, à 0 h, 6 h, 12 h, 18 h et 24 h, sont présentées (barre = 100 μm).

III. Expression de miR-135a et ROCK1 dans des échantillons de cancer de la prostate

1. L'expression de miR-135a diminue dans les tissus tumoraux et au cours de la progression du cancer de la prostate

Pour étudier le rôle potentiel de miR-135a dans le développement du cancer de la prostate, nous avons déterminé les taux d'expression de miR-135a, par RT-PCRq, dans 56 tumeurs et contre-parties saines issus de patients traités par prostatectomie.

Dans un premier temps, nous avons observé que l'expression de miR-135a dans le tissu cancéreux est significativement plus faible que dans le tissu sain adjacent (**Figure 33A**).

Comme miR-135a est impliqué dans les processus de migration et d'invasion cellulaire, nous avons recherché ensuite si son expression pouvait être corrélée à la progression du cancer de la prostate.

Pour cela, la relation entre le taux d'expression de miR-135a et le score de Gleason a été évaluée. La **Figure 33B** indique que le ratio de l'expression de miR-135a dans la tumeur par rapport à la contrepartie non cancéreuse pairée est inversement corrélée au grade pathologique (score de Gleason) du cancer de la prostate, avec une diminution significative entre les Gleason 3+3 et les autres groupes, ainsi qu'entre les Gleason 3+4 et les Gleason ≥ 8 . Ces données suggèrent donc un rôle de miR-135a dans la progression tumorale. De façon intéressante, l'expression de miR-135a est plutôt élevée dans la tumeur par rapport au tissu non-cancéreux pairé dans les scores de Gleason de 6 (3+3). Lorsque le score de Gleason augmente, on observe une diminution du pourcentage de patients pour lesquels le taux d'expression de miR-135a est supérieur ou égal dans le tissu cancéreux par rapport à la contrepartie saine. Enfin, tous les patients avec un score de Gleason ≥ 8 présentent une plus faible expression de miR-135a dans la tumeur par rapport au tissu non-cancéreux pairé (**Figure 33C**).

Nous avons également observé une diminution significative de l'expression de miR-135a entre les tumeurs localisées intraprostatiques (pT2c) et les tumeurs invasives, extra-prostatiques (pT3a et b), bien qu'on ne puisse pas séparer la dissémination dans les vésicules

séminales (pT3b) d'une invasion extra-prostatique ne touchant pas les vésicules séminales (pT3a) (**Figure 33D**). L'expression de miR-135a est donc inversement corrélée avec le stade pathologique, en particulier entre les tumeurs localisées et les tumeurs invasives.

Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre le taux d'expression de miR-135a et l'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux, l'âge du patient ou le taux de PSA pré-opératoire (**Figures 34A-C**).

En conclusion, nous avons observé que l'expression de miR-135a semble inversement corrélée au score de Gleason, ainsi qu'aux capacités d'invasion des cellules tumorales. Ces données suggèrent que la diminution de miR-135a pourrait refléter la progression du cancer de la prostate.

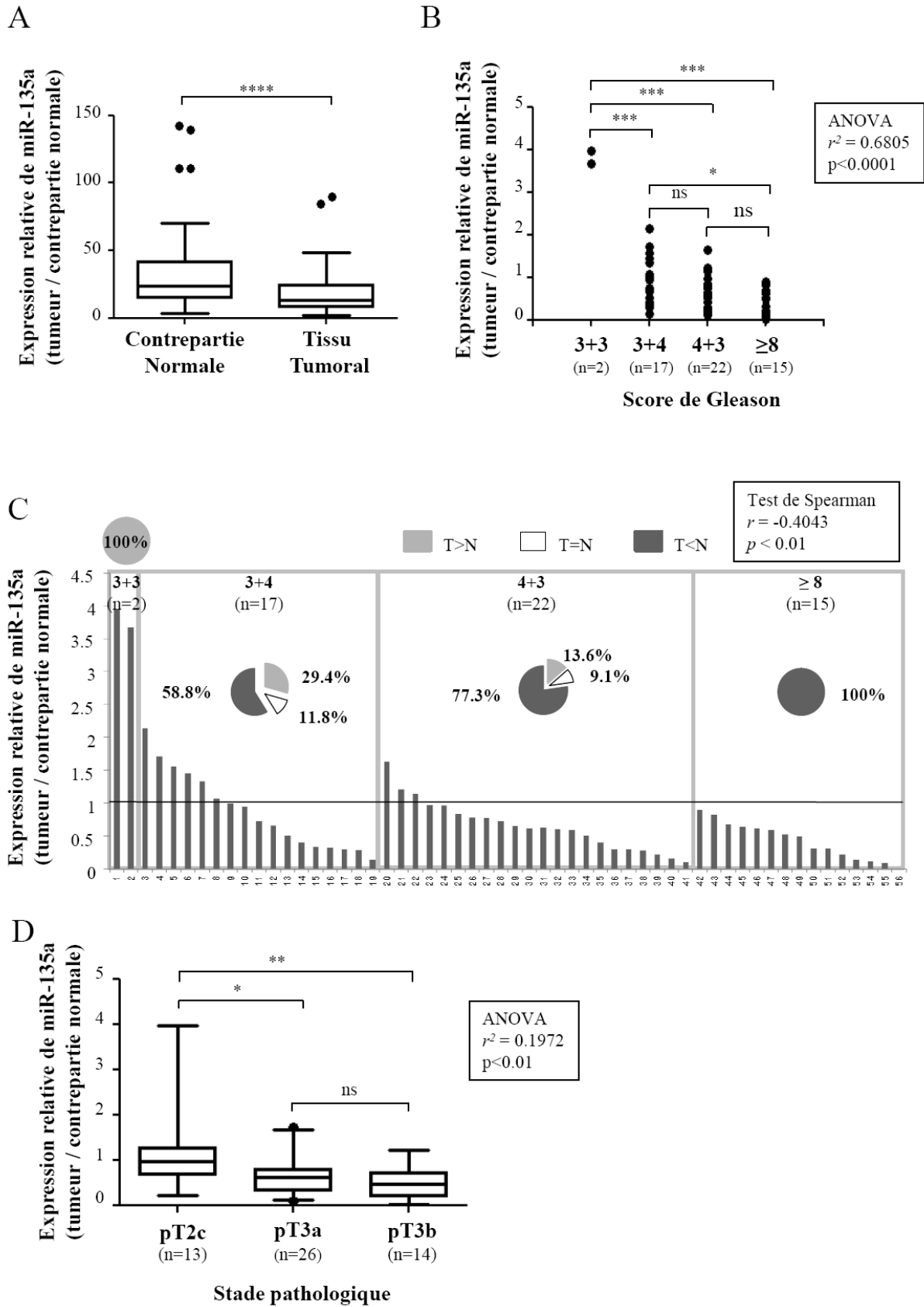


Figure 33 : L'expression de miR-135a est inversement corrélée à la progression tumorale.

RESULTATS

L'expression de miR-135a dans les tissus cancéreux et non-cancéreux adjacents de 56 échantillons issus de prostatectomie a été déterminée par RT-PCRq. Le taux d'expression de miR-135a dans les cellules primaires épithéliales de prostate (PrEC) a été utilisé comme calibrateur. Le haut et le bas de chaque boîte à moustache représente respectivement, le 75^{ème} percentile et le 25^{ème} percentile. La ligne au milieu représente la médiane des valeurs. Les valeurs extrêmes sont représentées par des cercles au-delà de la boîte à moustache.

ns, non-significatif; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

A. Expression différentielle de miR-135a entre 56 tissus tumoraux et leurs contreparties saines non tumorales, selon le test des rangs signés de Wilcoxon sur échantillons appariés.

B. Relation entre l'expression de miR-135a dans les échantillons de prostatectomie radicale (échantillons de tumeur versus contrepartie saine du même patient) et le score de Gleason. Une analyse ANOVA a révélé une différence entre les groupes avec une p-value $p < 0.0001$. Des analyses statistiques entre chaque groupe ont été réalisées par le test de comparaison multiple de Tukey-Kramer.

Score de Gleason de 6 (3+3), n = 2; Score de Gleason de 7 (3+4), n = 17; Score de Gleason de 7 (4+3), n = 22; Score de Gleason ≥ 8 , n = 15.

C. Corrélation entre l'expression de miR-135a dans les échantillons de prostatectomie radicale et le score de Gleason. Les numéros en ordonnée réfèrent aux patients. Les patients ont été rangés dans les 4 groupes de Gleason (présentés en **B.**) du cancer de la prostate, selon le ratio de l'expression de miR-135a dans la tumeur normalisée à la contrepartie saine. Le pourcentage des patients avec une expression de miR-135a supérieure, égale ou inférieure dans le tissu tumoral (T) par rapport à sa contrepartie normale (N) a été calculé et représenté respectivement en gris (T>N), en blanc (T=N) et en noir (T<N).

La valeur du coefficient de corrélation r a été calculée avec le test de Spearman ($r = -0.4043$) et est statistiquement significatif (**, $p < 0.01$); L'intervalle de confiance à 95% est de [-0.6082 to -0.1505].

D. Relation entre l'expression de miR-135a dans les prostatectomies (échantillon tumoral normalisé à la contrepartie saine du même patient) et le stade pathologique. L'analyse ANOVA a révélé une différence entre les groupes avec $p < 0.01$. Des analyses statistiques entre chaque groupe ont été réalisées par un test de comparaison multiple de Tukey-Kramer. pT2c, cancer localisé dans la capsule prostatique, n=13; pT3a, extension du cancer au-delà de la prostate mais sans invasion des vésicules séminales (VS), n=26; pT3b, cancer extra-prostatique avec invasion des VS, n=14.

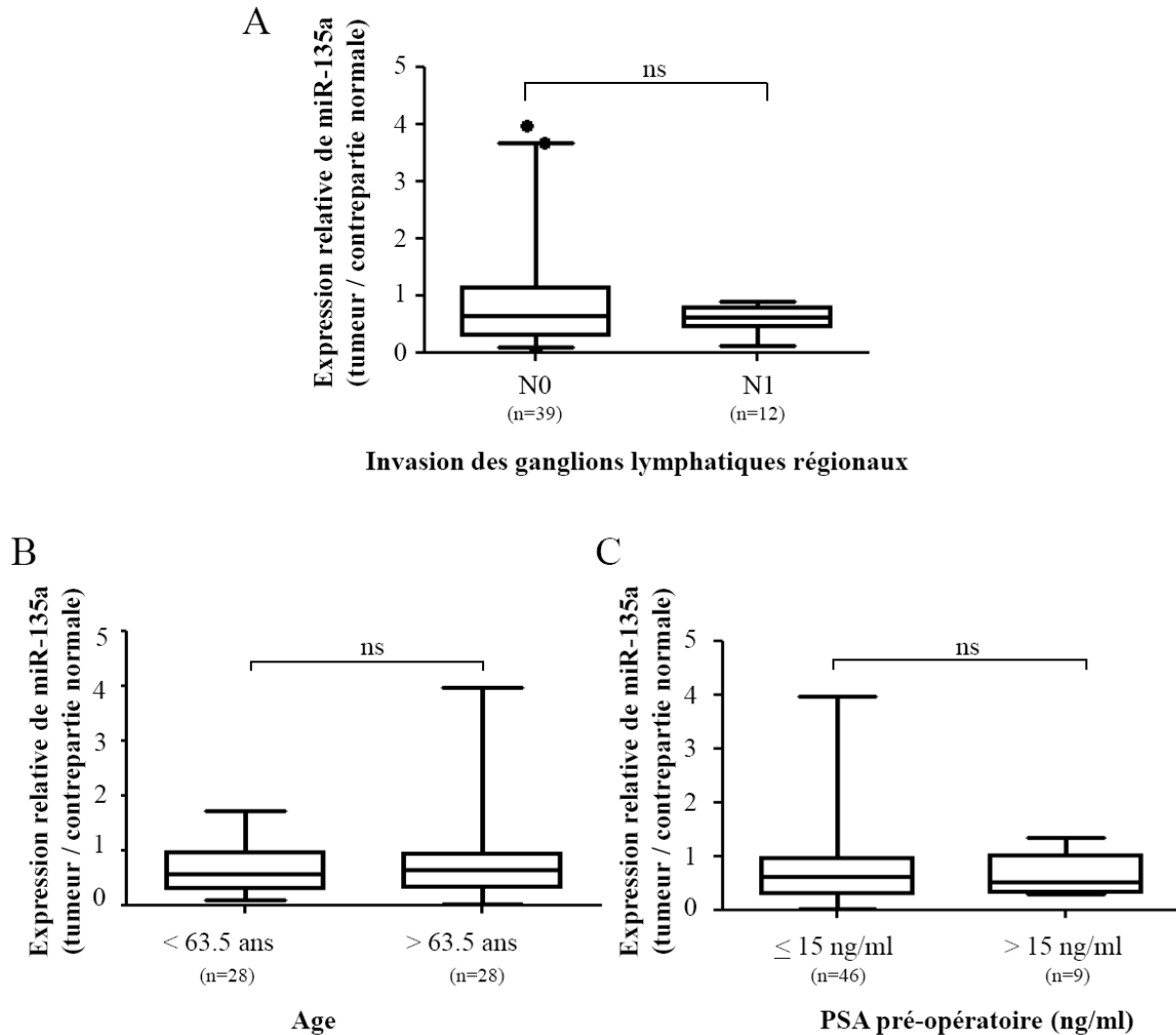


Figure 34 : L'expression de miR-135a n'est pas corrélée aux autres caractéristiques clinico-pathologiques.

Les taux d'expression relatifs de miR-135a dans les échantillons tumoraux par rapport aux contreparties normales paires du même patient ($n = 56$) ont été déterminés par RT-PCRq.

B. Relation entre l'expression de miR-135a dans les échantillons de prostatectomie radicale et l'invasion des ganglions lymphatiques régionaux. N0, pas de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux, $n = 39$; N1, présence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux, $n = 12$. Le haut de chaque boîte à moustache représente le 75^{ème} percentile [1.14 et 0.80 pour N0 et N1, respectivement] et le bas de chaque boîte à moustache représente le 25^{ème} percentile [0.30 et 0.43 pour N0 et N1, respectivement]. La ligne au milieu de chaque boîte à moustache représente la médiane des valeurs (0.65 et 0.62 pour N0 et N1, respectivement). ns, p -value non-significative par test de Student sur échantillons indépendants.

C. Relation entre l'expression de miR-135a dans les échantillons de prostatectomies radicales et l'âge des patients. Les échantillons ont été divisés en 2 groupes, en choisissant comme valeur seuil la médiane de l'âge des patients; > 63.5 ans, $n = 28$; < 63.5 ans, $n = 28$; Le haut de chaque boîte à moustache représente le 75^{ème} percentile [0.97 et 0.95 pour < 63.5 ans et > 63.5 ans, respectivement] et le bas de chaque boîte à moustache représente le 25^{ème} percentile [0.30 et 0.32 pour < 63.5 ans et > 63.5 ans, respectivement]. La ligne au milieu de

RESULTATS

chaque boîte à moustache représente la médiane des valeurs (0.57 et 0.64 pour < 63.5 ans et >63.5 ans, respectivement). ns, p -value non-significative par test de Student sur échantillons indépendants.

D. Relation entre l'expression de miR-135a dans les échantillons de prostatectomies radicales et les valeurs de PSA pré-opératoires. Les échantillons ont été divisés en 2 groupes, en choisissant comme valeur seuil la médiane des valeurs de PSA pré-opératoires; ≥ 15 ng/ml, $n = 46$; < 15 ng/ml, $n = 9$. Le haut de chaque boîte à moustache représente le 75^{ème} percentile [0.97 et 1.02 pour < 15 ng/ml et ≥ 15 ng/ml, respectivement] et le bas de chaque boîte à moustache représente le 25^{ème} percentile [0.30 et 0.31 pour < 15 ng/ml et ≥ 15 ng/ml, respectivement]. La ligne au milieu de chaque boîte à moustache représente la médiane des valeurs (0.63 et 0.53 pour < 15 ng/ml et ≥ 15 ng/ml, respectivement). ns, p -value non-significative par test de Student sur échantillons indépendants.

2. L'expression protéique de ROCK1 est plus forte dans les glandes prostatiques tumorales

MiR-135a régule négativement l'expression de ROCK1 ROCK2 FOXN3 et ESRRA et son expression diminue dans les échantillons prostatiques tumoraux par rapport à la contrepartie saine ainsi qu'au cours de la progression du cancer. Nous avons donc analysé l'expression d'un de ses gènes cibles, ROCK1 dans des échantillons provenant des mêmes patients.

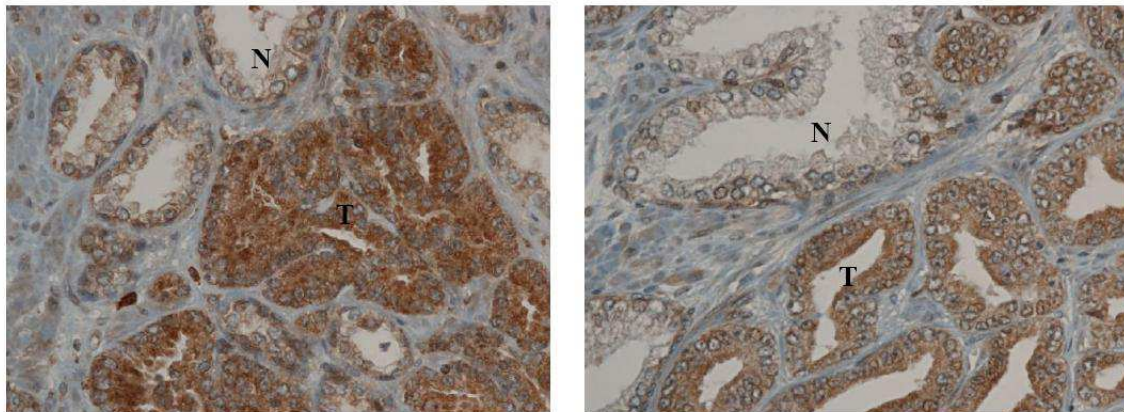
Nous avons, dans un premier temps, mesuré le taux d'ARNm de ROCK1 par RT-PCRq. Dans ces échantillons, nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression de ROCK1 et l'expression de miR-135a. De plus, l'expression de ROCK1 n'était pas plus forte dans les tissus cancéreux que dans les tissus sains (données non présentées).

Une immunohistochimie a donc été réalisée sur des coupes de prostate contenant des glandes normales et tumorales de 32 patients de la cohorte (**Tableau 5**). La protéine ROCK1 est exprimée dans le cytoplasme des cellules du stroma et de l'épithélium glandulaire (à la fois dans les cellules basales et dans les cellules luminales) (**Figure 35A**).

Une analyse semi-quantitative a révélé que le pourcentage de marquage « Fort » de la protéine ROCK1 est plus important dans les cellules luminales des glandes tumorales (34 %) par rapport aux glandes normales (16 %) (**Figure 35B**). Tous les grades pathologiques sont représentés dans cette analyse et nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression protéique de ROCK1 et le score de Gleason.

Ces résultats suggèrent que l'expression protéique de ROCK1 augmente dans les tissus tumoraux.

A



B

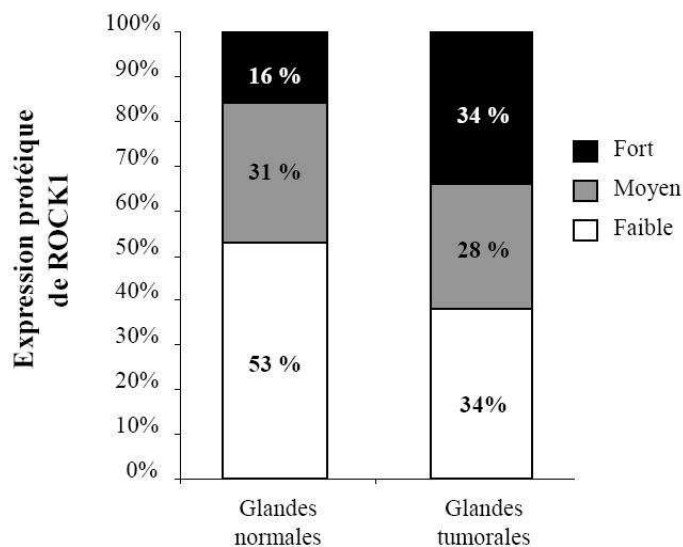


Figure 35 : Expression protéique de ROCK1 dans des tissus prostatiques tumoraux.

L'expression protéique de ROCK1 a été mesurée par IHC dans des échantillons de prostate de patients atteints de cancer de la prostate. Les coupes ont été réalisées dans une zone contenant du tissu normal et du tissu tumoral.

A. Images représentatives du marquage de la protéine ROCK1 dans les glandes normales (N) et tumorales (T), provenant de deux patients différents. Le signal positif est donné par un marquage DAB brun cytoplasmique. Grossissement x 400.

B. Répartition des échantillons en fonction de l'intensité de marquage de la protéine ROCK1 dans les glandes normales et tumorales. Une analyse semi-quantitative a été réalisée. Le degré de marquage a été évalué et classé dans les catégories « Fort », « Moyen » et « Faible ».

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. miR-135a, un miARN surexprimé par les androgènes, diminue la migration et l'invasion de cellules prostatiques tumorales, en ciblant ROCK1 et ROCK2

Les miARNs, comme les gènes dont la transcription dépend de l'ARN polymérase II, sont soumis à des régulations par les facteurs de transcription, dont le suppresseur de tumeur p53 (He *et al.*, 2007) et l'oncogène c-myc (O'Donnell *et al.*, 2005), régulant ainsi l'expression de miARNs suppresseurs de tumeurs et d'oncomiR, respectivement. AR, tout comme p53 et c-myc peut réguler l'expression de miARNs impliqués dans la tumorigenèse prostatique (Fletcher *et al.*, 2012; Jalava *et al.*, 2012; Ribas *et al.*, 2009).

Au cours de cette étude, nous avons identifié une famille de miARNs régulée par les androgènes dans des cellules prostatiques tumorales. Cette famille miR-135 est composée de deux membres, miR-135a et miR-135b. L'expression de ces deux miARNs augmente après stimulation androgénique, avec un différentiel d'expression plus fort pour miR-135a. La stimulation androgénique de l'expression de miR-135a est abolie en présence de bicalutamide ou de siARN anti-AR, indiquant que la régulation androgénique de miR-135a passe par AR.

Plusieurs groupes ont rapporté une régulation des miARNs par la voie de signalisation de AR. Sous stimulation androgénique, AR se fixe dans les séquences régulatrices en amont des miARNs et semble soit activer la transcription de gènes miR, entraînant une surexpression de miR-27a, miR-32, miR-148a et miR-21 (Fletcher *et al.*, 2012; Jalava *et al.*, 2012; Ribas *et al.*, 2009), soit réprimer la transcription et l'expression, comme par exemple du cluster miR-99a/let7c/125b-2 (Sun *et al.*, 2013). Cependant, plusieurs facteurs de transcription, dont p53 ou le récepteur aux œstrogènes lié aux œstrogènes, interagissent avec les hélicases du complexe Drosha et régulent, en plus de la transcription, le clivage du pri-miARN en pré-miARN (Suzuki *et al.*, 2009; Yamagata *et al.*, 2009). Cette régulation post-transcriptionnelle a été mise en évidence pour AR par Fletcher *et al.* (Fletcher *et al.*, 2012). AR induit une augmentation transitoire de la transcription du cluster miR-23a/27a/24-2 mais accélère de façon plus significative le clivage du pri-miARN par Drosha (Fletcher *et al.*, 2012).

miR-135a est présent sur deux loci dans le génome, *miR-135a1* et *miR-135a2*. Notre étude des mécanismes régulateurs de l'expression de miR-135a par les androgènes indique

que la surexpression de ce miARN résulte principalement de la régulation transcriptionnelle de *miR-135a2*. *miR-135a2* étant situé dans un intron du gène hôte non codant, RMST, il peut alors avoir sa propre unité de transcription ou être le produit de l'épissage de RMST. Puisque RMST n'est pas exprimé dans nos cellules, un site de début de transcription a été recherché et identifié, 554 paires de bases en amont de la première base du pré-miR-135a2. Ceci suggère que *miR-135a2* possède ses propres régions régulatrices de la transcription. Nous avons ensuite identifié un ARE fonctionnel, en amont du gène *miR-135a2*, et validé par ChIP que la liaison de AR dans cette région augmente en présence d'androgènes. Nos données sont en accord avec celles des ChIP-seq obtenues par Jalava *et al.*, (Jalava *et al.*, 2012) qui indiquent que AR se fixe dans des séquences proches de *miR-135a* dans les cellules LNCaP surexprimant ou non AR et soumises à régulation androgénique.

Beaucoup de miARNs surexprimés par les androgènes, tels que *miR-32*, *miR-148*, *miR-21*, et *miR-27a* sont oncogéniques, tandis que les miARNs réprimés par les androgènes, tels que *miR-99a*, semblent être suppresseurs de tumeurs (DeVere White *et al.*, 2009; Fletcher *et al.*, 2012; Jalava *et al.*, 2012; Ribas *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2012). Cependant, il existe certaines exceptions, comme par exemple *miR-34a*, dont l'expression est surexprimée par les androgènes alors qu'il joue un rôle de suppresseur de tumeur (Rokhlin *et al.*, 2008). Il semble donc que les androgènes puissent réguler positivement ou négativement l'expression de miARNs impliqués dans la tumorigenèse prostatique.

miR-135a a été montré comme pouvant jouer un rôle dans le développement (Pang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011c; Zhang *et al.*, 2012), ainsi que dans de nombreuses pathologies biologiques, telles que les pathologies musculaires (Greco *et al.*, 2009), métaboliques (Agarwal *et al.*, 2013), cardiovasculaires (Hoekstra *et al.*, 2010; Sober *et al.*, 2010) ou dans l'endométriose (Petracco *et al.*, 2011). Le rôle ainsi que l'expression de *miR-135a* ont été décrits dans plusieurs cancers et *miR-135a* joue un rôle différent dans chaque cancer étudié. Il peut être suppresseur de tumeur, comme par exemple dans le lymphome, gliome, cancer gastrique et cancer rénal, en régulant principalement la prolifération cellulaire et l'apoptose et en ciblant différents gènes tels que JAK2, STAT6, SMAD5, BMPR2 et c-myc (Navarro *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012a; Wu *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2012). Et au contraire, *miR-135a* peut être considéré comme un oncomiR dans le cancer colorectal, cancer du sein et dans la thrombose de la veine porte dans le carcinome hépatocellulaire, en ciblant APC, MTSS1 et HOXA10 et activant les propriétés de

prolifération, migration et invasion cellulaire (Butz *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2011c; Nagel *et al.*, 2008; Vickers *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012).

Afin d'identifier le rôle de miR-135a dans le cancer de la prostate, nous avons réalisé une analyse transcriptomique comparative des cellules LNCaP transfectées avec miR-135a par rapport aux cellules transfectées avec le contrôle négatif. Il a récemment été montré que l'action prédominante des miARNs entraîne une diminution des taux d'ARNm (Guo *et al.*, 2010), faisant des puces pangénomiques un outil efficace dans l'identification de nouvelles cibles de miARNs. L'étude des transcriptomes, suivie par une analyse *in silico* des séquences des 3'UTR des gènes sous-exprimés, a conduit à l'identification de gènes cibles potentiels de miR-135a. De plus, l'analyse Ingenuity des gènes dérégulés indique que le cycle cellulaire, la prolifération/survie/mort cellulaire et la morphologie/mouvement/organisation cellulaire sont des voies biologiques significativement enrichies dans les gènes dérégulés par la surexpression de miR-135a. Nous avons alors étudié la contribution de miR-135a dans ces processus cellulaires en surexprimant miR-135a dans les cellules prostatiques tumorales, PC-3, ayant des capacités de migration et d'invasion. L'étude fonctionnelle de miR-135a indique qu'une surexpression de ce miARN induit une diminution de la migration et de l'invasion des cellules prostatiques, sans modifier les capacités de prolifération, de survie et de mort cellulaire.

Parmi les gènes cibles potentiels de miR-135a impliqués dans les voies biologiques de la morphologie/mouvement/organisation cellulaire, nous nous sommes, dans un premier temps, focalisés sur ROCK1 (identifié à l'aide des puces pangénomiques suivie de l'analyse *in silico*) et ROCK2 (identifié par analyse *in silico* seule). Une surexpression de miR-135a entraîne une forte diminution de l'expression de ROCK1 et ROCK2 au niveau transcriptomique et protéomique, confirmant le rôle de miR-135a dans la régulation de ces gènes *ROCKs*. De plus, nous avons démontré une interaction de miR-135a avec la 3'UTR des ARNm de ROCK1 et ROCK2, confirmant que ces deux gènes sont des cibles directes de miR-135a.

Les ROCKs (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase), composés des deux membres ROCK1 et ROCK2, sont des protéines kinases activées par les protéines Rho-GTP. Les protéines ROCKs partagent une très forte homologie de séquence, principalement au niveau du domaine kinase (87% d'homologie), leur permettant de phosphoryler des protéines communes et d'avoir des fonctions similaires. Des différences de spécificité de substrat et par conséquent de rôle biologique sont probablement dues à de subtiles variations de localisation

cellulaire (Yoneda *et al.*, 2005). Les protéines ROCKs sont des régulateurs de l'organisation du cytosquelette d'actine et de l'interaction actine-myosine, leur permettant principalement d'intervenir dans les processus de motilité, d'adhésion et de contraction cellulaire (Amano *et al.*, 2010; Riento and Ridley, 2003). De plus, les ROCKs influencent d'autres processus tels que la transcription de gènes, la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la transformation oncogénique, bien que souvent les mécanismes moléculaires n'aient pas été entièrement caractérisés. La voie Rho/ROCK est importante pour la capacité des cellules tumorales à métastaser (del Peso *et al.*, 1997; Wyckoff *et al.*, 2006) et l'inhibition spécifique des ROCKs supprime la croissance tumorale et les métastases (Itoh *et al.*, 1999). Dans les cellules prostatiques PC-3, certaines données sont contradictoires (Vega *et al.*, 2011) mais il semblerait que RhoA soit un promoteur endogène critique de la migration et de l'invasion cellulaire (Hodge *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2006) et qu'une inhibition des ROCKs diminue la motilité des cellules PC-3, *in vitro*, ainsi que la dissémination métastatique *in vivo* (Somlyo *et al.*, 2000). ROCK1, stimulé par le hyaluronan, est également responsable de plus de 70% des transformations CRPC *in vivo* et dans les cellules PC-3, induisant une élévation importante de la prolifération et de l'invasion des cellules androgéno-indépendantes, ainsi que la formation de métastases (Lin *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008).

Par des tests de comblement de blessure, nous avons observé qu'une surexpression de miR-135a entraînait un retard dans la vitesse de fermeture de la blessure et qu'un effet similaire est observable quand ROCK1 et ROCK2 étaient inhibés (par une approche spécifique avec les siARNs et moins spécifique avec le Y-27632 qui peut cibler d'autres protéines kinases (Bain *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2000)). De plus, la morphologie des cellules PC-3 en migration, transfectées avec miR-135a, est similaire à celle obtenue en inhibant l'expression de ROCK1 et ROCK2, c'est-à-dire des cellules allongées avec de multiples protrusions. Les protéines ROCKs semblent jouer des fonctions complémentaires, puisqu'il a été montré que la déplétion de ROCK1 entraîne un allongement de la cellule avec un défaut de rétractation de la queue, tandis que la déplétion de ROCK2 induit la formation de multiples protrusions délocalisées (Vega *et al.*, 2011). Nous avons observé que la surexpression de ROCK1 dans les cellules surexprimant miR-135a rétablit le phénotype et les capacités de migration des cellules contrôles. Ces résultats suggèrent que ROCK1 et ROCK2 peuvent également avoir une fonction coopérative et que miR-135a inhibe la migration en régulant négativement l'expression de ces deux protéines.

En utilisant des tests d'invasion en inserts, les mêmes observations ont été faites : miR-135a diminue les capacités d'invasion des cellules PC-3 de la même façon qu'une inhibition de ROCK1 et ROCK2 et cet effet est aboli par la surexpression de ROCK1 dans les cellules surexprimant miR-135a.

L'ensemble de ces résultats indique un rôle du miARN androgéno-régulé miR-135a dans les processus de migration et d'invasion des cellules prostatiques tumorales, *via* l'inhibition de l'expression de ROCK1 et ROCK2. Il se pourrait donc que les androgènes induisent une diminution de la migration et de l'invasion cellulaire (**Figure 36A**), d'autant que nous avons montré qu'une stimulation androgénique entraînait une diminution de l'expression protéique de ROCK1 et ROCK2. Cependant, cette hypothèse n'a pas pu être validée puisque les cellules PC-3 ne répondent pas à une stimulation androgénique et que les cellules androgéno-sensibles LNCaP n'ont pas les capacités de migrer. De plus, AR régule d'autres protéines favorisant la migration cellulaire (Allioli *et al.*, 2011; Obinata *et al.*, 2012), indiquant que la régulation de ce processus migratoire est une régulation complexe mettant en jeu une balance entre plusieurs molécules activant ou inhibant la migration cellulaire.

Nous avons ensuite étudié l'expression de miR-135a dans des échantillons cliniques de patients atteints de cancer de la prostate, provenant de prostatectomies. Les taux de miR-135a sont significativement réduits dans les échantillons cancéreux, en comparaison au tissu sain adjacent du même patient. La diminution de miR-135a avait déjà été rapportée dans les gliomes (Wu *et al.*, 2011), lymphomes (Navarro *et al.*, 2009), cancer gastrique (Wu *et al.*, 2012a) et carcinome rénal (Hidaka *et al.*, 2012), dans lesquels il jouait un rôle de suppresseur de tumeur. A l'inverse, la surexpression de miR-135a dans les tumeurs a été montrée dans le cancer du sein (Chen *et al.*, 2012), le carcinome hépatocellulaire (Liu *et al.*, 2011c) et le cancer colorectal (Nagel *et al.*, 2008; Vickers *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012).

Puisque miR-135a est impliqué dans les processus de migration et d'invasion cellulaire, nous avons comparé l'expression de miR-135a avec les paramètres d'agressivité de la tumeur. Nous avons mis en évidence une relation entre la diminution du ratio d'expression de miR-135a (dans la tumeur par rapport au tissu sain adjacent) et le score de Gleason, ou le stade pathologique, bien que l'expression de miR-135a ne puisse pas statistiquement séparer tous les groupes entre eux. Une telle répartition des taux d'expression de miR-135a nous conduit à considérer miR-135a comme un biomarqueur potentiel pour évaluer la progression du cancer de la prostate.

Etant donné l'implication de miR-135a dans la régulation des ROCKs, la perte de miR-135a durant la progression tumorale pourrait être associée à l'augmentation des capacités d'invasion des cellules cancéreuses et à la dissémination métastatique (**Figure 36B**).

En effet, l'expression protéique de ROCK1 est plus forte dans les glandes tumorales par rapport aux glandes normales, suggérant que son expression est augmentée dans les tissus tumoraux. Une étude a d'ailleurs été réalisée, précédemment, sur l'expression de ROCK1 dans des échantillons tumoraux prostatiques, indiquant qu'elle augmente dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain et que cette augmentation est corrélée avec l'apparition de métastases distantes (Bu *et al.*, 2011).

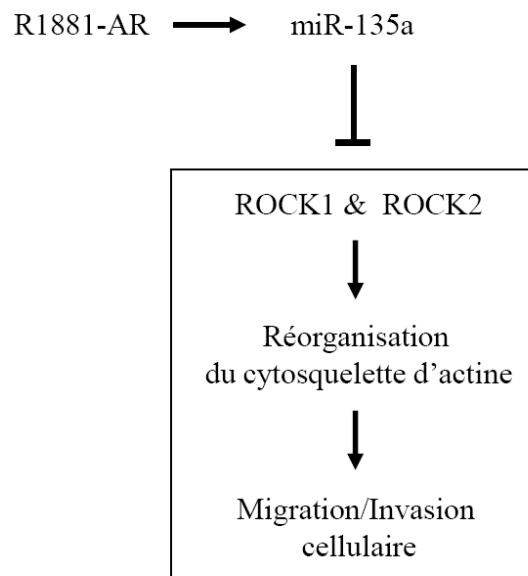
Notre analyse de l'expression protéique de ROCK1 n'a pas révélé de relation avec le score de Gleason, le grade pathologique ou l'expression de miR-135a. L'étude a été effectuée sur des échantillons issus du tissu prostatique de 32 patients de la cohorte utilisée pour miR-135a. Cependant, pour l'immunohistochimie, les coupes ont été réalisées dans le tissu tumoral, dans lequel on observe des glandes normales tandis que pour la RT-PCRq sur miR-135a, nous avons comparé l'expression du miARN entre du tissu tumoral et du tissu sain du même patient mais dans deux zones distinctes. Il serait peut être intéressant d'étudier l'expression protéique de ROCK1 par Western Blot dans des échantillons similaires à ceux utilisés pour l'analyse de l'expression de miR-135a. Ceci nous permettrait de savoir si l'expression de ROCK1 est corrélée à celle de miR-135a. L'analyse protéique de ROCK1 dans les autres échantillons de la cohorte, ainsi que celle de ROCK2 vont également être réalisées.

L'expression de ROCK1 ou de ROCK2 est élevée dans plusieurs cancers (cancer du sein (Lane *et al.*, 2008) ostéosarcome (Liu *et al.*, 2011d), cancer gastrique (Wu *et al.*, 2013), cancer du côlon (Vishnubhotla *et al.*, 2007), cancer de la vessie (Kamai *et al.*, 2003) et cancer du foie (Wong *et al.*, 2009)). Néanmoins un taux élevé de protéine n'est pas nécessairement corrélé à une augmentation de l'activité des ROCKs. Dans les cancers, l'activité des ROCKs peut être augmentée par des mutations (Greenman *et al.*, 2007; Lochhead *et al.*, 2010), par une surexpression ou hyperactivation des Rho (Burbelo *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2000; Fritz *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 1999) ou par une régulation des nombreux partenaires d'interaction des ROCKs (Morgan-Fisher *et al.*, 2013). De nombreux composés ont donc été développés pour inhiber l'activité des ROCKs et, malgré leur rôle prometteur dans la thérapie anti-cancéreuse de nombreux cancers, dont le cancer de la prostate, aucun n'est actuellement utilisé en clinique. (Amine *et al.*, 2009; Rattan *et al.*, 2006; Routhier *et al.*, 2010; Somlyo *et al.*, 2000; Spencer *et al.*, 2011).

En conclusion de cette première partie, nous avons identifié une nouvelle voie de signalisation par les androgènes sur les cellules prostatiques cancéreuses, à travers la régulation de l'expression du miARN miR-135a et de ses gènes cibles, ROCK1 et ROCK2.

Nous avons observé que miR-135a est sécrété par les cellules prostatiques en culture et qu'il est présent dans le sérum humain (données non présentées). La valeur pronostique de miR-135a comme biomarqueur potentiel d'agressivité du cancer de la prostate est donc actuellement à l'étude. Cette étude est réalisée par un dosage sérique de miR-135a dans le sérum de patients atteints de cancer de la prostate. Cette partie validation clinique fait actuellement l'objet d'une demande de brevet français.

A



B

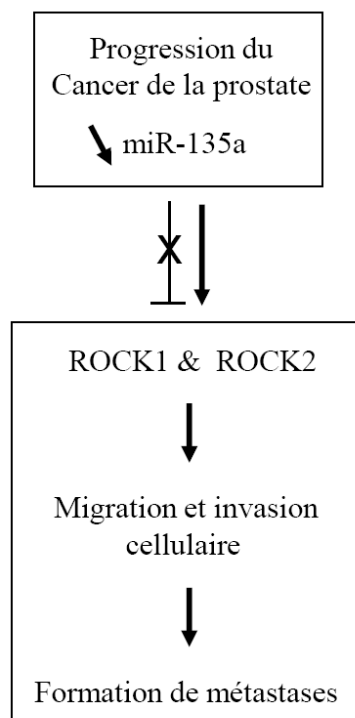


Figure 36 : Modèle pour expliquer le rôle potentiel de miR-135a, un microARN androgéno-régulé, dans le cancer de la prostate, *via* la régulation de ROCK1/2.

A. Une stimulation androgénique entraîne une augmentation de l'expression de miR-135a, qui inhibe la migration et l'invasion cellulaire en régulant négativement l'expression des cibles ROCK1/2.

B. Une diminution de l'expression de miR-135 durant la progression tumorale peut conduire à une surexpression de ROCK1/2, qui favorise la migration et l'invasion cellulaire, contribuant à la formation de métastases.

II. miR-135a semble être impliqué dans la voie de signalisation androgénique

La seconde partie de ce travail a mis en évidence un rôle potentiel de miR-135a dans la signalisation androgénique. Les résultats obtenus dans cette partie sont encore à un stade préliminaire et nécessitent d'être approfondis.

Parmi les gènes cibles potentiels de miR-135a, identifiés par l'analyse transcriptomique comparative des cellules LNCaP transfectées avec miR-135a par rapport aux cellules transfectées avec le contrôle négatif, nous avons identifié deux gènes potentiellement impliqués dans la voie de signalisation de AR : ESRRA et FOXN3.

ESRRA (ERR α) est un récepteur nucléaire, qui, comme les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires, est capable de réguler l'expression de gènes cibles grâce à sa fixation à l'ADN sur des sites spécifiques de liaison, appelés Eléments de Réponse aux ERRs (ERRE), dans les séquences régulatrices de gènes cibles (Sladek *et al.*, 1997; Vanacker *et al.*, 1999; Vega and Kelly, 1997). Cependant, il ne se lie pas aux œstrogènes ou d'autres ligands physiologiques connus et est donc classé comme récepteur nucléaire orphelin (Horard and Vanacker, 2003). En plus de réguler l'expression de ses gènes cibles, ERR α peut interférer avec la voie de signalisation du récepteur aux œstrogènes (Giguere, 2002) et de AR (Teyssier *et al.*, 2008). Une inhibition spécifique de ERR α entraîne une diminution de l'expression de gènes androgéno-régulés, suggérant qu'une augmentation de ERR α pourrait aider les cellules à passer le blocage exercé par les anti-androgènes durant l'échappement à l'hormonothérapie dans le cadre du cancer de la prostate (Teyssier *et al.*, 2008).

Le rôle de FOXN3 dans la voie de signalisation androgénique n'a pas encore été étudié. FOXN3, aussi appelé CHES1, fait partie des facteurs de transcription de la famille FOX (Kaufmann and Knochel, 1996). Comme AR, ils sont capables d'interagir avec l'ADN, mais également avec d'autres protéines, dont des activateurs ou répresseurs de transcription, ainsi que des complexes de réparation de l'ADN (Almeida *et al.*, 2007; Brenkman *et al.*, 2010; Roesch *et al.*, 2008). Un gène de la famille FOX a en particulier été fortement étudié dans la voie de signalisation de AR, le facteur FOXA1. FOXA1 se lie aux motifs FOX sur l'ADN, dans des régions de chromatine fortement compactées, et induit le relâchement. Avec son potentiel d'ouverture de la chromatine, il est appelé facteur « pionnier », et peut ainsi permettre à d'autres facteurs de transcription de déclencher des programmes transcriptionnels

(Magnani *et al.*, 2011; Zaret *et al.*, 2008). Il favorise ainsi le recrutement de cofacteurs et/ou facilite la liaison de AR à l'ADN (Gao *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011a).

Nous avons dans un premier temps validé la régulation de l'expression de ESRRA et FOXN3 par miR-135a. Une surexpression de miR-135a entraîne une forte diminution de l'expression de ESRRA et FOXN3 au niveau transcriptionnel et protéique, confirmant le rôle de miR-135a dans la régulation de ces gènes. De plus, nous avons démontré une interaction de miR-135a avec la 3'UTR des ARNm de ESRRA et FOXN3, indiquant que ces deux gènes sont des cibles directes de miR-135a. Cependant, l'étude de l'expression de ESRRA et FOXN3 dans les cellules stimulées aux androgènes indique que ESRRA semble être soumis à d'autres régulations androgéniques que celle passant par la surexpression de miR-135a. Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à FOXN3.

Nous avons ensuite mis en évidence que FOXN3 pouvait contribuer à l'activité transcriptionnelle de AR, sous stimulation androgénique, en augmentant la transcription du gène rapporteur soumis à la régulation par les androgènes. FOXN3 joue donc un rôle d'activateur de l'activité transcriptionnelle de AR.

Il semblerait que FOXN3 n'ait pas le même mode d'action que FOXA1 ou FOXP1 qui régulent l'activité de AR en se liant sur des sites de liaison spécifiques sur l'ADN à proximité de sites de liaison de AR (Gao *et al.*, 2003; Sahu *et al.*, 2011; Takayama *et al.*, 2008). En effet, en régulant l'expression du gène rapporteur contenant trois AREs fonctionnels en amont du promoteur, il semble que FOXN3 n'ait pas besoin de sites de liaison particuliers pour réguler l'activité transcriptionnelle de AR. Un autre facteur FOX, FOXO1 est capable de réguler l'activité transcriptionnelle de AR sur un gène rapporteur contenant trois AREs (Liu *et al.*, 2008). A l'inverse de FOXN3, FOXO1 inhibe l'activité transcriptionnelle de AR et l'étude de son mécanisme d'action indique qu'il agit en partie en recrutant des HDAC (Liu *et al.*, 2008). FOXN3 pourrait donc agir comme coactivateur de AR ou recruter des coactivateurs pour activer l'activité transcriptionnelle de AR.

De plus, comme FOXN3, dont l'expression est inhibée par les androgènes, de nombreux facteurs FOX ont leur expression régulée par les androgènes. Une étude analysant l'expression de 38 facteurs FOX sous stimulation androgénique indique que 24 d'entre eux sont surexprimés (dont FOXA1 et FOXP1) et quatre sont sous-exprimés (Takayama *et al.*, 2008). Les facteurs FOX sont donc fortement impliqués dans la voie de signalisation androgénique, en tant qu'effecteurs de AR et/ou en tant que régulateurs de l'activité de AR.

Une étude plus approfondie du rôle de miR-135a dans l'activité transcriptionnelle de AR est nécessaire mais ces résultats suggèrent déjà que miR-135a, dont l'expression est augmentée par les androgènes, régule négativement l'expression de FOXN3, qui active l'activité transcriptionnelle de AR. Si cette régulation est validée, on obtiendrait, peut être, une boucle de rétrocontrôle négative de l'expression du miR-135a, qui contrôlerait sa propre production.

Ce mécanisme de boucle de régulation entre miARNs et facteurs de transcription a déjà été bien décrit dans la littérature, décrivant des boucles de rétrocontrôle positives ou négatives, impliquant un ou plusieurs miARNs et facteurs de transcription (Arora *et al.*, 2013). Dans le cancer de la prostate, des miARNs ciblant AR ou son activité transcriptionnelle ont été identifiés et présentent un intérêt particulier dans la progression du cancer, en particulier vers une forme résistante à la castration. Par exemple, miR-130a, miR-203 et miR-205 interfèrent avec la voie de signalisation de AR en réprimant des coactivateurs de AR (CDK1, PSAP, PSMC3IP et PARK7) ainsi qu'en inhibant la voie de signalisation de MAPK qui facilite l'activation de AR (Boll *et al.*, 2012). miR-141 et miR-27a ciblent également des corépresseurs de AR (Shp et prohibitine, respectivement) augmentant ainsi l'activité transcriptionnelle de AR (Fletcher *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2012). D'autres miARNs régulent négativement l'expression ou l'activité de AR. Let-7c inhibe la transcription de AR en ciblant c-myc (Nadiminty *et al.*, 2012), miR-488*, miR-31 et miR-124 ciblent directement AR (Lin *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2012; Sikand *et al.*, 2011) et miR-17-5p réprime l'expression d'un coactivateur de AR, p300/CBP (Gong *et al.*, 2012).

Le mécanisme de régulation de l'activité transcriptionnelle de AR par FOXN3 n'a pas encore été déterminé. Une étude des gènes cibles de FOXN3 par séquençage d'ARN (RNAseq) des cellules LNCaP transfectées avec un siFOXN3 ou un contrôle négatif et stimulées ou non aux androgènes est actuellement en cours. Cette étude nous permettra d'identifier les gènes régulés par FOXN3, mais également ceux conjointement régulés par FOXN3 et AR. La liaison potentielle de FOXN3 à proximité de AR sera évaluée par ChIP et l'interaction de FOXN3 et AR sur des sites de régulation de gènes cibles de AR pourra être validée par re-ChIP.

Avec sa fonction de facteur de transcription ainsi que d'activation de l'activité transcriptionnelle de AR, FOXN3 pourrait induire un changement du transcriptome des cellules dans certaines conditions, comme par exemple au cours de la transformation des cellules prostatiques tumorales androgéno-sensibles vers une forme CRPC.

Une étude *in silico*, basée sur des données de puces comparant l'expression globale de gènes dans des tissus de prostate de patients ayant un CRPC ou un CaP dépendant des androgènes a identifié un ensemble de facteurs de transcription et de miARNs pouvant potentiellement créer une telle différence d'expression génique (Wang *et al.*, 2008a). Les données indiquent que la famille des miR-135 contribuerait à une surexpression globale de gènes dans les tissus CRPC. Or les miARNs induisant principalement une diminution de l'expression de leurs gènes cibles, ces données suggèrent une diminution de l'expression de ces miARNs dans les CRPC par rapport aux PCa.

Nous avons effectivement observé une diminution de l'expression de miR-135a dans les cellules MOP et C4-2B, cellules dérivant des cellules LNCaP et devenues résistantes après une privation en androgènes, *in vitro* et *in vivo* respectivement (**Figure 37**). Ces résultats sont en accord avec les données de Ma *et al* (Ma *et al.*, 2011) qui ont rapporté une telle diminution dans la lignée LNCaP-LNO par rapport aux LNCaP. Il se pourrait donc que pendant l'évolution du CaP en CRPC, la diminution de l'expression de miR-135a induise une levée de l'inhibition de FOXN3, qui pourrait activer l'activité transcriptionnelle de AR et participer ainsi au mécanisme d'adaptation des cellules en conditions de privation en androgènes.

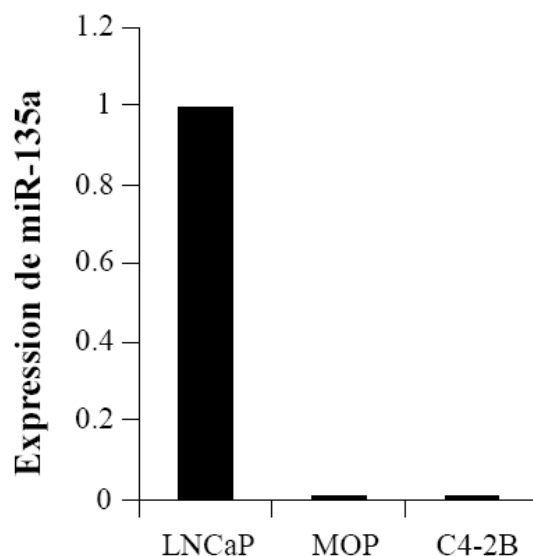


Figure 37 : Expression de miR-135a dans différentes lignées cellulaires.

Taux d'expression de miR-135a dans les cellules MOP et C4-2B, dérivant des cellules LNCaP et devenues résistantes à la privation en androgènes, par rapport au taux d'expression dans les cellules androgéno-sensibles LNCaP.

FOXN3 a été, dans un premier temps, isolé d'un crible destiné à l'identification d'ADN complémentaires (ADNc) impliqués dans la régulation de points de contrôle du cycle cellulaire chez *S. cerevisiae* (Pati et al., 1997). FOXN3 peut fonctionner comme répresseur transcriptionnel dans plusieurs types cellulaires humains (Scott and Plon, 2005), notamment en interagissant avec SKIP, une protéine adaptatrice de la transcription qui, selon le type cellulaire et le contexte du promoteur, recrute soit des complexes d'activation, soit des complexes de répression de la transcription. De plus, FOXN3 supprime la croissance cellulaire et induit un arrêt des cellules de cancer oral en phase G2/M (Chen *et al.*, 2011b) et inhibe l'entrée dans le cycle de cellules de cancer du poumon (Li *et al.*, 2012a).

Nous avons alors étudié le rôle de FOXN3 dans les cellules prostatiques LNCaP soumises à une stimulation androgénique, par inhibition spécifique de son expression. Nous avons ainsi observé qu'une inhibition de l'expression de FOXN3 induisait une diminution de la prolifération des cellules stimulées au R1881. Il semble donc, qu'en présence d'androgènes, l'expression de FOXN3 permette de réguler l'expression de gènes impliqués dans la prolifération des cellules de cancer de la prostate. L'activité de AR modulant l'expression de gènes associés à la régulation du cycle cellulaire, de la survie et de la prolifération cellulaire (Knudsen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2006), il se pourrait que FOXN3 régule ces processus en activant l'activité transcriptionnelle de AR.

Le rôle de miR-135a dans ce processus n'a pas encore été évalué mais puisque miR-135a régule négativement l'expression de FOXN3, il se pourrait qu'une diminution de l'expression de miR-135a augmente la prolifération des cellules cancéreuses dépendante des androgènes.

Nous avons déjà mis en évidence que l'expression de miR-135a diminuait au cours de la progression tumorale. Ces résultats suggèrent que cette diminution pourrait alors entraîner une augmentation de la prolifération cellulaire dépendante des androgènes. Cependant, nous avons également montré que AR régule positivement l'expression de miR-135a, induisant une diminution de l'expression de FOXN3. La voie de régulation *via* miR-135a pourrait donc être utilisée comme boucle de régulation négative de l'activité de AR, qui lorsqu'elle est dérégulée au cours de la progression tumorale, favorise la prolifération cellulaire.

MiR-135a étant impliqué dans la régulation des processus de migration cellulaire, nous avons étudié la contribution de FOXN3 dans cette voie biologique, dans les cellules PC-3. De façon intéressante, une inhibition spécifique de FOXN3 induit un retard de la vitesse de

comblement de blessure, comme la surexpression de miR-135a. Il nous reste encore à étudier l'effet de la réexpression de FOXN3, dans les cellules surexprimant miR-135a. Nous saurons alors si cette voie de signalisation est une voie principale dans la régulation de la migration cellulaire par miR-135a, comme nous avons mis en évidence pour les protéines ROCKs, ou non.

L'étude du rôle de miR-135a dans la voie de signalisation de AR, à travers la régulation de FOXN3, nécessite encore d'être approfondie. En particulier, l'étude fonctionnelle de FOXN3, *via* l'étude de ses gènes cibles, est nécessaire à la compréhension des mécanismes d'action. L'expression de FOXN3 pourra également être évaluée en tant de biomarqueur potentiel du cancer de la prostate.

Le rôle de miR-135a pourra encore être approfondi, notamment *via* la validation d'autres gènes cibles et la découverte d'autres mécanismes d'action de ce miARN. En particulier, nous avons observé qu'une surexpression de miR-135a induisait un retard d'adhésion des cellules PC-3 en plaques 96-puits (**Figure 38**). Ce retard n'étant pas aboli lorsqu'on surexprime ROCK1 ou FOXN3 dans les cellules surexprimant miR-135a, d'autres gènes cibles de miR-135a peuvent donc influencer ce processus.

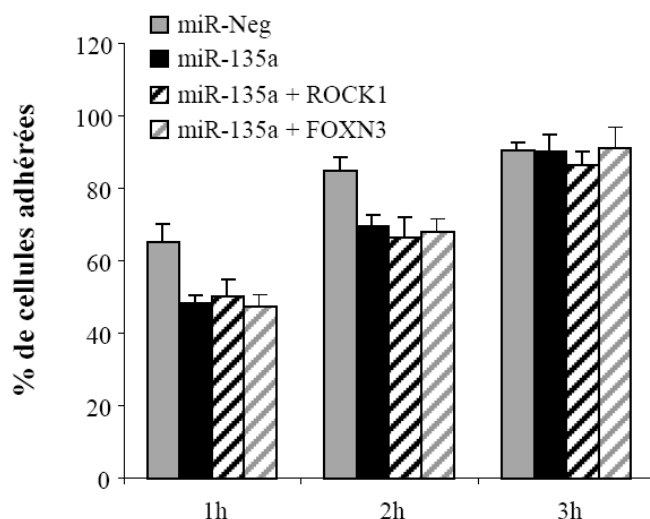


Figure 38 : miR-135a induit un retard d'adhésion des cellules PC-3

Analyse de l'adhésion cellulaire par observation de la quantité de cellules fixées sur le support 1 h, 2 h et 3 h après ensemencement des cellules PC-3. Les cellules PC-3 ont été précédemment transfectées avec le contrôle négatif (miR-NC) ou miR-135a mimic puis, 24h après, avec les plasmides d'expression ROCK1 ou FOXN3, pCAGmycROCK1 ou pcDNA3.1(+)-FOXN3, respectivement.

A plus long terme, l'étude des effets de miR-135a, *in vivo*, sur la croissance tumorale, l'échappement du contrôle anti-androgénique sur la croissance de la tumeur et les capacités métastatiques sera réalisée chez la souris. L'effet sur la croissance tumorale pourra être évalué en greffant les cellules LNCaP transfectées avec miR-135a en sous-cutané dans des souris nudes mâles. En utilisant des souris castrées, nous pourrions également suivre l'évolution de la tumeur vers une forme résistante à la castration. Enfin, la greffe de cellules PC-3 dans l'os (partie proximale du tibia), permettra d'évaluer le rôle de miR-135a dans la formation de métastases osseuses et dans la destruction de l'os, grâce à leurs propriétés d'ostéolyse. Il faudra pour cela, perfectionner un système stable surexprimant miR-135a dans les cellules.

Le projet peut également se poursuivre avec l'étude du deuxième membre de la famille des miR-135, miR-135b. Nous avons montré que miR-135b est également régulé par les androgènes, et tout comme miR-135a, sa régulation est dépendante de AR (**Figure 39**). Cependant, nous n'avons pas encore identifié les mécanismes d'action des androgènes sur la régulation de son expression. La séquence de miR-135b diffère de celle de miR-135a d'une seule base et ces deux miARNs de la famille des miR-135 ont la même séquence seed, suggérant qu'ils puissent réguler les mêmes gènes cibles. miR-135b pourrait donc agir en synergie avec miR-135a et pourrait lui aussi contribuer à l'évolution du cancer de la prostate.

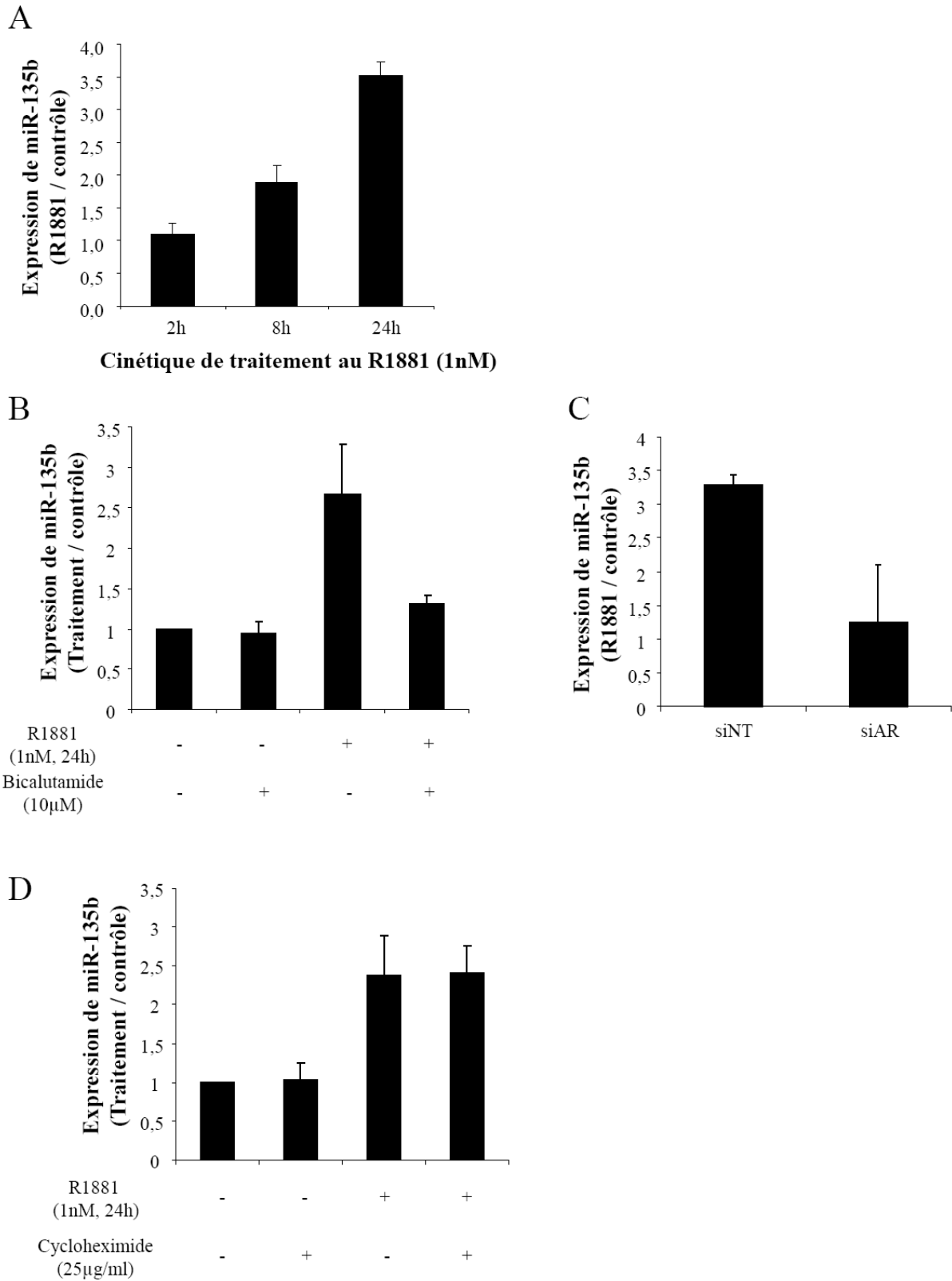


Figure 39 : Régulation androgénique de l'expression de miR-135b

L'expression de miR-135b mature a été quantifiée par RT-PCRq. Les cellules LNCaP ont été stimulées avec 1 nM d'androgène synthétique R1881. Les données sont présentées en tant que différentiel d'expression de miR-

135b dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

A. Cinétique d'expression de miR-135b dans les cellules LNCaP stimulées par les androgènes, en comparaison aux cellules contrôles non stimulées.

C. Taux d'expression de miR-135b dans les cellules LNCaP, soumises à un traitement anti-androgénique (10 μ M bicalutamide), une stimulation androgénique (R1881), ou un traitement combiné (R1881 + bicalutamide), en comparaison aux cellules contrôles non traitées.

D. Taux d'expression de miR-135b dans les cellules LNCaP transfectées pendant 48h avec 50nM d'ARN interférent (siARN) dirigé contre le récepteur aux androgènes AR (si-AR) ou avec un si-contrôle (si-NT), et soumises ou non à un traitement androgénique (R1881 ; 24 h).

E. Taux d'expression de miR-135b dans les cellules LNCaP, soumises à un traitement à la cycloheximide, une stimulation androgénique (R1881), ou un traitement combiné (R1881 + cycloheximide), en comparaison aux cellules contrôles non traitées.

CONCLUSION GENERALE

Cette étude nous a permis de mettre en évidence le rôle joué par miR-135a dans le cancer de la prostate.

miR-135a est un miARN dont l'expression est augmentée par les androgènes *via* l'action génomique du récepteur aux androgènes AR sur la transcription du gène miR-135a2. Ce miARN cible et régule négativement l'expression de ROCK1 et ROCK2, deux effecteurs de la voie Rho/ROCK impliqués dans les processus de migration et d'invasion cellulaires et dans la formation de métastases. miR-135a inhibe la migration et l'invasion de cellules prostatiques tumorales et cette fonction est abolie par la réintroduction de ROCK1 dans les cellules. Il semble donc que le rôle de miR-135a dans l'inhibition de la migration et de l'invasion passe par la régulation négative de l'expression des ROCKs.

De plus, miR-135a cible et régule négativement l'expression de FOXN3, un facteur FOX impliqué dans la régulation du cycle cellulaire dont le rôle n'est pas encore bien connu. L'étude fonctionnelle de FOXN3 a révélé l'implication de FOXN3 dans la régulation transcriptionnelle de AR. Les mécanismes d'action n'ont pas encore été identifiés et sont actuellement à l'étude. FOXN3 est également impliqué dans les processus de prolifération cellulaire dépendant des androgènes, ainsi que dans la migration cellulaire. Le rôle de miR-135a dans ces processus doit encore être étudié, mais il se pourrait que miR-135a soit également impliqué dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de AR ainsi que de la prolifération cellulaire en régulant FOXN3.

miR-135a est globalement sous-exprimé dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain de patients atteints de cancer de la prostate, suggérant un rôle suppresseur de tumeur pour ce miARN. Cependant la diminution de l'expression de miR-135a a lieu principalement dans les échantillons de score de Gleason élevé, avec 100% de diminution dans les échantillons de scores de Gleason supérieurs ou égaux à 8. De plus, l'expression de miR-135a diminue dans les cancers extra-prostatiques par rapport aux cancers intra-prostatiques, indiquant préférentiellement un rôle de miR-135a comme marqueur de la progression tumorale.

Au cours de la progression tumorale, l'expression de miR-135a diminue, pouvant entraîner une levée de l'inhibition de l'expression de FOXN3 et des ROCKs et donc une activation de la prolifération cellulaire dépendante des androgènes, de la migration et de l'invasion cellulaire, permettant aux cellules de proliférer, se déplacer et métastaser (**Figure 40**).

La voie de signalisation de miR-135a est placée sous le contrôle de la signalisation androgénique et miR-135a cible FOXN3 qui active l'activité transcriptionnelle de AR. Comme l'expression de miR-135a diminue dans les cellules devenues androgéno-indépendantes, il se pourrait que miR-135a soit également impliqué dans l'agressivité des cellules des tumeurs CRPC.

L'ensemble de ces résultats suggère un rôle important de miR-135a dans la progression du cancer de la prostate ainsi qu'un rôle de biomarqueur potentiel d'agressivité du cancer.

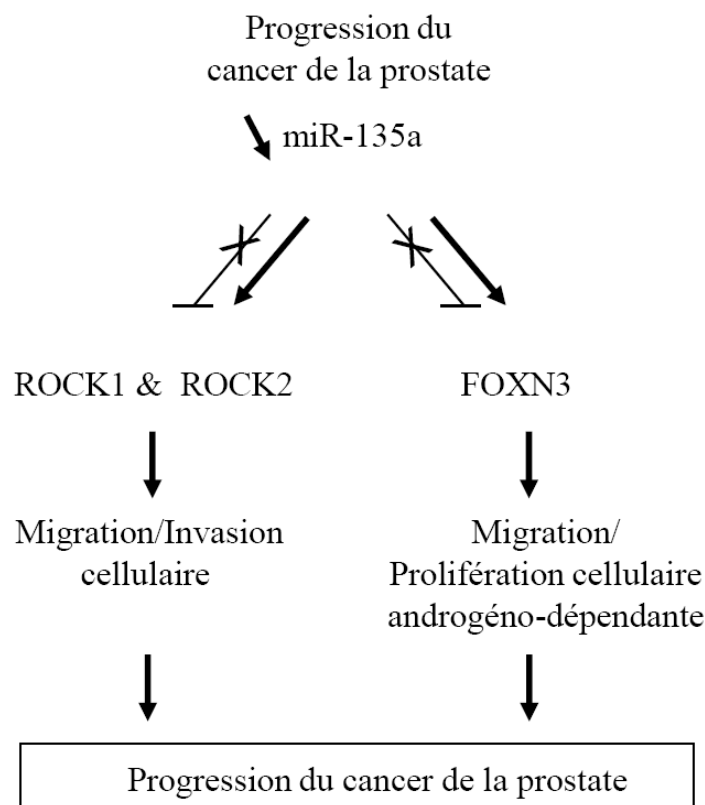


Figure 40 : Modèle du rôle potentiel de miR-135a au cours de la progression du cancer de la prostate.

Durant la progression tumorale, l'expression de miR-135a est graduellement diminuée, suggérant une augmentation de l'expression de ROCK1/2 et FOXN3, qui activent la migration, l'invasion et la prolifération androgéno-dépendante des cellules prostatiques, contribuant à la progression du cancer et à la formation de métastases.

MATERIEL ET METHODES

Culture cellulaire : Les lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate, LNCaP et PC-3 ont été commandées à l'ATCC (American Type Culture Collection). Les lignées cellulaires dérivant des cellules LNCaP, MOP (un don du Pr Jean André) et C4-2B (achetées à ViroMed Laboratories), ont été maintenues en culture selon les conditions décrites précédemment (Joly-Pharaboz *et al.*, 2000), ou selon les indications du fournisseur, respectivement. Les cellules primaires épithéliales de prostate, les PrEC, ont été cultivées selon les indications du fournisseur (Lonza). Les cellules HeLa ont été cultivées d'après les conditions de l'ATCC.

Réactifs chimiques : L'androgène synthétique méthyltriènone (R1881) a été acheté chez Perkin Elmer. Le bicalutamide est un don de Astra Zeneca (Royaume-Unis) et l'Actinomycine D a été achetée chez Sigma-Aldrich. Ces trois produits ont été dissous dans l'éthanol absolu. La cycloheximide et le Y-27632 (un don du Dr VANACKER) provenant de Sigma-Aldrich ont été dissous respectivement dans le DMSO et dans l'eau.

Traitement androgénique : Les cellules LNCaP ont été privées en stéroïdes durant 48h, cultivées dans le milieu RPMI-1640 sans rouge phénol supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal (SVF) filtré sur charbon, puis stimulées au R1881. Pour un traitement anti-androgénique, le bicalutamide (10 μ M) a été ajouté dans le milieu 30 min avant le R1881. Lorsque le traitement avec la cycloheximide est combiné à la stimulation androgénique, 25 μ g/ml de cycloheximide ont été ajoutées au milieu au même moment que le R1881. Pour inhiber la transcription, l'Actinomycine D (1 μ M) a été ajoutée 6h après stimulation au R1881.

Extraction d'ARN : L'ARN total, dont les miARNs, a été extrait des cellules ou des échantillons de tissu, avec le réactif d'extraction TriPURE (Roche). La concentration en ARN a été dosée par une lecture de densité optique en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop et la qualité a été vérifiée par la technologie Lab-on-Chip (Agilent).

Expression globale des miARNs dans les cellules LNCaP stimulées : Une réaction de transcription inverse a été réalisée à partir de 500 ng d'ARN total, selon le kit TaqMan® microRNA Reverse Transcription et avec les primers Megaplex RT Primers Human Pool A

v2.1 (Applied Biosystems). Une PCR quantitative à haut débit de 377 microARNs et 3 contrôles endogènes a été réalisée avec le kit TaqMan® Array Human MicroRNA A Cards v2.0 (Applied Biosystems), selon les instructions du fournisseur. Les valeurs ont été normalisées au taux médian de RNU6B, RNU44 et RNU48. Le différentiel d'expression des miARNs après stimulation au R1881 a été déterminé selon la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La sélection des miARNs a été basée sur les analyses statistiques réalisées par le logiciel RealTimeStatMiner® (Integromics).

Quantification du taux de miR-135a mature par RT-PCRq : Les réactions de transcription inverse ont été réalisées à l'aide du kit TaqMan® microRNA Reverse Transcription et des primers TaqMan® small RNA (Applied Biosystems), avec 200 ng d'ARN total pour miR-135a et miR-135b ou 10 ng d'ARN total pour U6 snRNA. La PCR quantitative a été réalisée selon le protocole du kit noUNG TaqMan® Universal Master PCR mix (Applied Biosystems). L'expression de miR-135a ou miR-135b a été normalisée par rapport au niveau d'expression du contrôle interne U6 snRNA.

Pour les échantillons humains de prostatectomies, les réactions de transcription inverse ont été réalisées avec 10 ng d'ARN total et l'expression de miR-135a a été normalisée par l'expression de RNU24. La quantification relative a été réalisée en utilisant la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Quantification des taux de pri-miARN et d'ARNm par RT-PCRq : Les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés à partir de 1 µg d'ARN total traité à la DNaseI, selon le kit First-Strand cDNA Synthesis (Life Technologies). La PCR quantitative a été réalisée selon la procédure du kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen) en utilisant les primers listés ci-dessous pour les pri-miARNs, ROCK1 et ROCK2 ou les QuantiTect Primers (Qiagen) pour FOXN3 et ESRRA. Les valeurs ont été normalisées par la médiane d'expression de 3 gènes de ménage (TBP, RPS17, RPLP0; QuantiTect Primers, Qiagen). La quantification relative a été réalisée en utilisant la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Pri-miR-135a1 Sens 5'-GTTGGGGTGAAGAAGTG-3'

Pri-miR-135a1 Anti-sens 5'-GGCTCCAATCCCTATATGA-3'

Pri-miR-135a2 Sens 5'-GGTTAGCTTTGAAATGGTTG-3'

Pri-miR-135a2 Anti-sens 5'-TCCATCCCTACATGAGACTT-3'

ROCK1 Sens 5'-TACCAGCTGCAAGCTATATTAGA-3'

ROCK1 Anti-sens 5'-TTCGAGATTATGTTTGAGATGC-3'

ROCK2 Sens 5'-ATCAAAGAGATGATGGCTAGAC-3'

ROCK2 Anti-sens 5'-GCAAGATTGGCAACATCAC-3'

5'RACE : L'ARN (1µg) extrait des cellules LNCaP avec le kit RNeasy mini kit (Qiagen) a été utilisé pour déterminer le site de début de transcription (TSS) du pri-miR-135a2 en utilisant la reverse transcriptase SuperScript III (55°C) et le système 5'RACE (Life Technologies) pour une amplification rapide des extrémités de l'ADNc. Les primers spécifiques de pri-miR-135a2 sont : GSP1 pour la RT : 5'-TCCATCCCTACATGAGACTTT-3'; GSP2 pour la première PCR : 5'-ATCTTGGTCGGATGCAAAAC-3' ; GSP3 pour la PCR nested : 5'-CTTCACATGACTTCACAACC-3'. Le produit de PCR a été cloné par TA cloning dans le plasmide pGEM-Teasy (Promega) puis séquencé.

Test rapporteur luciférase pour l'identification d'AREs fonctionnels : Les fragments en amont de miR-135a2 ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADN génomique de cellules LNCaP (primers listés ci-dessous) et clonés dans le pGL3-promoteur, un vecteur rapporteur luciférase Firefly (Promega). Deux mutations ponctuelles dans l'ARE-2 ont été insérées à l'aide du kit QuikChange II XL site-directed mutagenesis (Stratagene). Les cellules HeLa ont été cotransfectées avec 500 ng de vecteur rapporteur luciférase Firefly, 10 ng de vecteur d'expression de AR, pSG5-hAR, et 50 ng de plasmide luciférase Renilla pGL4.73 (Promega), avec de l'Exgen500 (Euromedex), selon les instructions du fournisseur. Le milieu a été remplacé le lendemain avec du milieu contenant ou non 1 nM R1881. 24 h après, les cellules ont été lysées avec du Passive Lysis Buffer (Promega) et les activités luciférases Firefly/Rénilla ont été déterminées à l'aide du kit Dual Luciferase Assay System (Promega). L'activité luciférase relative correspond à l'activité luciférase des cellules stimulées par rapport à celle des cellules contrôles.

-1402/-22 Sens 5'-GGTACCAAGGAGAGATGTGGTAGAGG -3'

-1402/-22 Anti-sens 5'-GCTAGCTGGTCGGATGCAAAACTTAT -3'

-6762/-5522 Sens 5'-GGTACCAGCTGCTATTTTCATCATTTG -3'

-6762/-5522 Anti-sens 5'-GCTAGCTAAGCCATCGGCCAGAACTC -3'

-8822/-7622 Sens 5'-GGTACCTCTACAGCATATGGCATTGC -3'

-8822/-7622 Anti-sens 5'-GCTAGCCAGAATGAAGATTACTGAGGC -3'

ARE-2 mutant :

Sens 5'-GGGTCTTGGTCAACAAGTAAAGCTTTTTCTCCTTCGTCATGG-3' ;

Anti-sens 5'-CCATGACGAAGGAGAAAAAGCTTTACTTGTTGACCAAGACCC -3'

Immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) : $7,5 \cdot 10^6$ cellules LNCaP, cultivées en milieu privé en stéroïdes, ont été traitées ou non avec 1 nM R1881 pendant 24 h. Les ChIP ont été réalisées à l'aide du kit ChIP-IT express (Active Motif). Les échantillons ont été immuno-précipités sur la nuit à 4°C avec 6 µg/ml d'anticorps anti-AR (H-280, sc-13062, Santa Cruz Biotechnology). L'ADN purifié a été analysé par PCRq avec les primers suivants :

Histone H4 promoteur Sens 5'-AAATGGTGGGATCACAGACG-3'

Histone H4 promoteur Anti-sens 5'-CGAGCTTCTTGTTTCCGTGT-3'

TBP promoteur Sens 5'-GTGGCGGTCCACATAAAAAC-3'

TBP promoteur Anti-sens 5'-GTCCTCTCATGCCCTGTGTT-3'

PSA AREIII Sens 5'-ACAGACCTACTCTGGAGGAAC-3'

PSA AREIII Anti-sens 5'-AAGACAGCAACACCTTTTT-3'

miR-135a2 ARE-2 Sens 5'-GGCCAGGTTGTTAAAGCACT -3'

miR-135a2 ARE-2 Anti-sens 5'-CATCGGCCAGAACTCTTAGC -3'

Pour un locus génomique particulier le % de chromatine immuno-précipitée par rapport à la chromatine de départ a été calculé selon la formule : $\% = [2^{(Ct \text{ chromatine de départ} - Ct \text{ ChIP})}] \times 100$ et la liaison de AR sur ce locus a été déterminé par : $\% (\text{locus spécifique}) / \% (\text{locus de H4})$. En final le différentiel d'enrichissement a été calculé comme le ratio de la liaison de AR dans les cellules traitées au R1881 par rapport aux cellules contrôles.

Test rapporteur luciférase pour l'étude du rôle de FOXN3 sur l'activité transcriptionnelle de AR : Il existe deux protéines FOXN3, une forme courte de 468 aa et une longue de 490 aa. Le cadre de lecture ouvert (ORF) correspondant à la protéine longue de FOXN3 a été amplifié par PCR à partir d'ADNc de cellules LNCaP (primers listés ci-dessous) et clonée dans le vecteur pcDNA3.1(+) (Invitrogen).

Les cellules HeLa ont été cotransfectées avec 500 ng d'un vecteur rapporteur luciférase Firefly contenant 3 AREs probasine en amont du gène, 10 ng de vecteur d'expression de AR pSG5-hAR, 50 ng de plasmide luciférase Renilla pGL4.73 (Promega) et 100, 200 ou 400ng de pcDNA3.1(+) vide ou contenant l'ORF de FOXN3, avec de la Lipofectamine 2000, selon les instructions du fournisseur. Le milieu a été remplacé le lendemain avec du milieu contenant ou non 1 nM R1881. 24 h après, les cellules ont été lysées avec du Passive Lysis Buffer (Promega) et les activités luciférase Firefly/Rénilla ont été déterminées à l'aide du kit

Dual Luciferase Assay System (Promega). L'activité luciférase relative correspond à l'activité luciférase des cellules stimulées par rapport à celle des cellules contrôles.

-FOXN3 Sens 5'-CCACCATGGGTCCAGTCATGCCTCC -3'

-FOXN3 Anti-sens 5'-TTAATTTTTTGTGGTTTCCT -3'

Hybridation in situ (HIS) : Trois coupes de paraffine (6 µm) ont été réalisées dans les tissus prostatiques humains. L'HIS a été réalisée à l'aide du kit miRCURY LNATM microRNA ISH (Exiqon), selon le protocole du fournisseur, avec des sondes spécifiques pour miR-135a (température d'hybridation, 52 °C), le contrôle positif U6 snRNA ou le contrôle négatif scrambled (Exiqon), marquées DIG avec des acides nucléiques modifiés (LNA). Les signaux ont été détectés avec l'anticorps anti-DIG-AP et le substrat NBT/BCIP. Enfin, les coupes ont été montées dans le milieu de montage Eukitt® (VWR).

Transfection de miARN, d'ARN interférent et de plasmides : Les miARN mimics (50 nM miR-135a ou miR-NC pour le contrôle négatif « negative control#2 »; Applied Biosystems) et les vecteurs pCAGmycROCK1 (un don de MF Olson), pcDNA3.1(+)FOXN3 et pmirGLO ont été transfectés dans les cellules avec la Lipofectamine2000 (Life Technologies). Les ARN interférent (siARN) anti-AR, anti-ROCK1, anti-ROCK2, anti-FOXN3 ou le contrôle négatif si-Non Targeting (si-NT) (50 nM ON-TARGET^{plus} SMARTpool, Dharmacon) ont été transfectés dans les cellules avec le DharmaFECT (Dharmacon).

Identification de gènes régulés par miR-135a par la technologie des puces pangénomiques : Le profil d'ARN des cellules LNCaP a été analysé avec le kit Human Whole Genome GE 4x44k V1 oligonucleotides microarray (Agilent). Les ARN anti-sens (ARNa) ont été amplifiés, selon le protocole d'Ambion (AminoAllyl MessageAmp II aRNA amplification kit, Ambion), à partir de 2 µg d'ARN total de cellules LNCaP ont été transfectées avec miR-135a mimic ou miR-NC pendant 24 et 48 h. Les ARNa ont été couplés chimiquement au Cy-monoreactive dye ester (Amersham) et purifiés. Les ARNa marqués Cy3/Cy5 (1µg) ont été fragmentés à 60°C pendant 30 min dans le tampon de fragmentation et l'agent de blocage (Agilent), selon les instructions du fournisseur. A la fin de la réaction de fragmentation, le tampon d'hybridation Agilent a été ajouté. Les ARNa marqués Cy3/Cy5 ont été hybridés de façon compétitive (miR-135a versus miR-NC) sur les lames pendant 18 h à 62°C dans un four à hybridation. Chaque expérience a été répétée en échangeant les sondes fluorescentes Cy3/Cy5 pour tenir compte des effets des marqueurs. Quatre points de données

par spot d'hybridation ont été produits, en utilisant les échantillons à 24h et 48h post-transfection. Après plusieurs lavages, les lames ont été séchées et analysées.

Les puces ont été scannées sur un scanner Agilent DNA Microarray, en utilisant des réglages de numérisation à deux couleurs (canaux Cy3 et Cy5) pour des lames 4x44k, selon les instructions du fournisseur. La quantification des sondes a été réalisée avec le logiciel Feature Extraction Software 10.5 (Agilent) et des fichiers de données ont été générés. La soustraction du bruit de fond et la normalisation loess ont été réalisées avec le package Limma (Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004;3:Article3) en R. La normalisation des quantiles a été ajoutée pour la normalisation entre lames. Les contrôles et les sondes de mauvaise qualité ou de faible intensité, dans les deux canaux, ont été enlevés. Seules les sondes présentes dans les 4 expériences ont été analysées (21 257 sondes) et utilisées pour l'analyse statistique.

Les données ont été déposées au NCBI's Gene Expression Omnibus et sont disponibles *via* le numéro d'accèsion GEO GSE45903, avec le lien suivant :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE45903>

Extraction de protéines et Western Blot : Les cellules ont été collectées dans du PBS/1mM EDTA froid, lavées et lysées pendant 45 min à 4°C dans le tampon TNE (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) contenant 0.5% Igepal, 1 mM DTT et des inhibiteurs de protéases (Complete, Roche). Les lysats cellulaires ont ensuite été centrifugés à 12 000 g pendant 15 min à 4°C et le surnageant collecté. La concentration en protéines a été quantifiée à l'aide du kit DC Protein Assay (Bio-Rad). 50 µg de protéines ont été analysées par Western blot avec les anticorps anti-ROCK1 (GTX113266, 1:500, GeneTex), anti-ROCK2 (sc-1851, 1:200, Santa Cruz), anti-ESRRA (2131-1, 1:5000, Epitomics), anti-FOXN3 (A303-620A, 1:5000, Bethyl laboratories) et anti-β-Tubuline (T4026, 1:4000, Sigma-Aldrich). Les taux d'expression protéique ont été quantifiés avec le logiciel MultiGauge et normalisés par rapport à ceux de la β-Tubuline.

Test rapporteur luciférase pour l'interaction 3'UTR/miARN : Les 3'UTR de *ROCK1* (nt 1-920), *ROCK2* (nt 1-816), *ESRRA* (92-491) et *FOXN3* (31-900), ont été amplifiées par PCR à partir d'ADN génomique de cellules LNCaP (primers listés ci-dessous) et clonés en aval du gène luciférase Firefly dans le vecteur pmirGLO (Promega). Les sites de liaison à miR-135a ont été ensuite délétés par PCR. 6 x 10⁴ cellules HeLa ensemencées en plaques 24-puits ont

été cotransfectées avec 200 ng de pmirGLO et les miARN mimics (50 nM). Deux jours plus tard, les cellules ont été lysées et les activités luciférase Firefly/Rénilla ont été déterminées avec le kit Dual Luciferase Assay System (Promega).

3'UTR ROCK1 Sens 5'- CCATGTGACTGAGTGCCCTG -3'

3'UTR ROCK1 Anti-sens 5'- AATGCAACCCCCATTGAAAG -3'

3'UTR ROCK2 Sens 5'- CTGCCTTCTATGAAAGCAGT -3'

3'UTR ROCK2 Anti-sens 5'- TCCTAAGAGCTGGTAAACGC -3'

3'UTR ESRRA Sens 5'-GCCACAGCCTGCTGGCAGGG-3'

3'UTR ESRRA Anti-sens 5'-CCTCAATAACGAAGTTCCCC-3'

3'UTR FOXN3 Sens 5'-GACCATTGTTTTCAGCATG-3'

3'UTR FOXN3 Anti-sens 5'-GACACAGCTTGTTTTCCCA-3'

Etude du cycle cellulaire : Les cellules PC-3 ont été transfectées avec le miR-135a mimic ou le contrôle négatif (miR-NC) pendant 24 h avant d'être fixées à l'éthanol 70% pendant 60 min à -20°C. Les cellules ont ensuite été lavées et marquées avec 40 µg/ml d'Iodure de Propidium (PI, Sigma) et 200 µg/ml de RNaseA (Roche) dans du PBS. 10⁴ événements ont été analysés avec le cytomètre de flux BD LSRII Flow et le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été déterminé par le modèle mathématique, « Watson Pragmatic model », du logiciel FlowJo.

Prolifération cellulaire : Les cellules PC-3, transfectées 24h avec le miR-135a mimic ou le contrôle négatif (miR-NC), ont été mises en présence de BrdU pendant 4 h. Les cellules en prolifération ayant incorporé le BrdU sont révélées, après perméabilisation membranaire, avec un anticorps anti-BrdU couplé à l'APC, selon le kit APC BrdU Flow kit (BD Biosciences). La quantification des cellules en prolifération a été réalisée par cytométrie de flux.

Mesure de la viabilité cellulaire : Les cellules PC-3 ont été transfectées avec le miR-135a mimic ou le contrôle négatif (miR-NC) pendant 24h. La viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide du kit Vialight Plus cell Proliferation and Cytotoxicity Bioassay (Lonza). Les mesures d'ATP dans les cellules métaboliquement actives ont été déterminées avec un luminomètre.

Mesure de l'apoptose cellulaire : Les cellules PC-3 ont été transfectées avec le miR-135a mimic ou le contrôle négatif (miR-NC). L'apoptose cellulaire a été mesurée par deux méthodes différentes.

La première est un double marquage DIOC6 (3,3',9,9'-tetramethyl-6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Molecular Probes) –PI analysé au cytomètre de flux, 8h-24h après transfection. Les cellules ont été incubées 15 min à 37 °C avec 40 nM DIOC6 pour évaluer l'activité mitochondriale. Le PI (0,5 µg/ml) a été ajouté et incorporé dans l'ADN des cellules mortes, dont la membrane est perméable. Les cellules vivantes sont DIOC6+PI- tandis que les cellules apoptotiques sont DIOC6-PI- (apoptose précoce) ou DIOC6-PI+ (apoptose tardive). Les cellules DIOC6+PI+ sont en nécrose.

La deuxième méthode consiste à mesurer l'activité de la Caspase 3 avec le kit caspase-3/CPP32 fluorometric assay (Biovision). La caspase 3 activée présente dans le lysat protéique peut cliver le substrat DEVD-AFC. L'AFC libre a été quantifié avec un fluorimètre et l'activité de la caspase 3 a été déterminée par le coefficient directeur de l'équation de la droite de la fluorescence en fonction du temps. Une transfection d'un vecteur d'expression de Bax a été utilisée comme contrôle positif de l'apoptose.

Test de comblement de blessure (Wound Healing) : 4.10^5 cellules PC-3 ont étéensemencées dans des plaques 6-puits et soit transfectées avec miR-NC, miR-135a, siROCK1, siROCK2 ou siFOXN3, soit traitées avec 16 µg/ml de Y-27632. Deux jours plus tard, une blessure a été formée en grattant doucement le tapis cellulaire à l'aide d'un cône de micropipette et les débris cellulaires ont été enlevés par deux lavages. Des microphotographies en contraste de phase ont été enregistrées, immédiatement après la blessure et à 5 minutes d'intervalle pendant 48h, avec un système de microscopie Time-Laps (Axiovert100M, Zeiss). La vitesse de fermeture de la blessure a été mesurée avec le programme Image J (YATAK, Yet Another Tool for Analysis of Kymographs). Pour la réexpression de ROCK1 ou FOXN3, 2 µg de pCAGmycROCK1 ou pcDNA3.1(+)-FOXN3 ont été transfectés 24h après la transfection de miR-135a.

Test d'invasion cellulaire : Des inserts 24-puits (8 µm pore size; PET Fluoroblock membrane; BD Biosciences) ont été recouverts de 50 µl de Matrigel dilué au 1:25 (300 µg/ml de protéines; Matrice basale réduite en facteurs de croissance; BD Biosciences), et incubés à 37 °C pendant 3h. Les cellules PC-3 ont été soit transfectées avec miR-NC, miR-135a, siROCK1 ou siROCK2, soit traitées avec 16 µg/ml de Y-27632 et, 5 h après, cultivées pendant 48 h en milieu sans sérum contenant 1% BSA. Les cellules ont été ensuite marquées 1 h à 37°C avec 10 µg/ml DiIC₁₂(3) (BD Biosciences). Après lavages, la suspension cellulaire de cellules PC-3 marquées au DiI (10^5 cellules en 250 µl de milieu sans sérum) a été

ensemencée dans les inserts fluoroblock (recouverts ou non de Matrigel) et placée dans un puits contenant du milieu à 10% de SVF. Après 30h de culture, les cellules DiI+, ayant traversé la membrane, ont été comptées dans 4 champs pris au hasard par membrane. Les données sont exprimées en pourcentage de cellules invasives : nombre de cellules étant passées à travers la membrane recouverte de Matrigel / nombre de cellules ayant migré à travers la membrane non traitée x 100. Pour la réexpression de ROCK1, 2 µg de pCAGmycROCK1 ont été transfectés 24h après la transfection de miR-135a.

Immunofluorescence : Les cellules PC-3 ont étéensemencées à $0,5 \cdot 10^5$ ou $2 \cdot 10^5$ cellules par puits en plaques 6-puits contenant 4 lamelles puis transfectées avec le miR-135a mimic ou le contrôle négatif miR-NC. 48h après la transfection, les cellules, fixées à 4% PFA, ont été perméabilisées dans 0.5% Triton et saturées dans 0.3% BSA. L'actine cellulaire a été marquée à la Phalloïdine couplée au TRITC (Sigma-Aldrich (un don du Dr VANACKER); 1/5 000) pendant 45 minutes et les noyaux ont été marqués 10 min avec du Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich; 1/25 000). Après lavage, les lamelles ont été montées, dans le milieu de montage, sur lames.

Test d'adhésion cellulaire : Les cellules PC-3 ont été transfectées avec miR-135a mimic ou miR-NC. 48 h après transfection, les cellules ont été récupérées, comptées et $2 \cdot 10^4$ cellules ont été réensemencées en plaque 96 puits et incubées pendant 1 h, 2 h, 3 h et 8 h. Les cellules ont été fixées pendant 10 min par ajout de glutaraldéhyde (Sigma-Aldrich ; 1.1%), rincées, puis colorées 20 min au Cristal Violet (Sigma-Aldrich ; 0.1%). Après un dernier lavage, le cristal violet a été dissout avec de l'acide acétique 10% et la densité optique à 590 nm a été mesurée avec un spectrophotomètre lecteur de plaque. Les données ont été normalisées par rapport à celles obtenues à 8 h et sont exprimées en pourcentage de cellules adhérentes à 1h, 2 h et 3 h par rapport au nombre de cellules adhérentes à 8h. Pour la réexpression de ROCK1 ou FOXN3, 2 µg de pCAGmycROCK1 ou pcDNA3.1(+)FOXN3 ont été transfectés 24h après la transfection de miR-135a.

Echantillons de tissus humains : Les cas cliniques ont tous été sélectionnés au Centre Hospitalier Lyon-Sud. Un protocole de recherche biomédical non-interventionnel pour la conservation des échantillons de tissu, après la chirurgie prostatique a été mis en place au Centre Hospitalier Lyon-Sud avec l'approbation du comité éthique de Lyon (CPP Sud-Est 2; faculté de médecine et le conseil médical d'état) pour ces recherches. Un consentement averti

a été obtenu de tous les patients dans ces études, avant toute conservation d'échantillon pour une utilisation en recherche. Les échantillons de tissu prostatique avec un adénocarcinome acinaire classique et leur contrepartie adjacente normale ont été obtenus à partir de prostatectomies radicales de 56 patients, réalisées entre Janvier 2003 et Janvier 2012. Aucun de ces patients n'a reçu de chimiothérapie préopératoire ou de thérapie par radiation. Les informations cliniques des patients sont données dans les **Tableaux 4 et 5** suivants.

Immunohistochimie (IHC) : Des coupes de tissus de 3 μm d'épaisseur ont été préparées à partir de 32 échantillons de prostate inclus en paraffine. Le marquage immunohistochimique a été réalisé dans l'automate Ventana Benchmark Ultra XT avec le kit ultraview DAB Detection Kit (Ventana). Les coupes ont été marquées pendant 28 min avec l'anticorps primaire anti-ROCK1 (GTX113266, GeneTex) à une dilution de 1:80.

Analyse statistique : Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5. Une p-value < 0.05 est considérée comme statistiquement significative.

Tableau 4 : Caractéristiques pathologiques des échantillons de patients atteints de cancer de la prostate.

	Total (n=56)	Faible¹ (n=0)	Intermédiaire² (n=16)	Elevé³ (n = 40)
Score de Gleason				
6	3,57 % (2)	0 % (0)	12,5 % (2)	0 % (0)
7 (3+4)	30,36 % (17)	0 % (0)	43,75 % (7)	25 % (10)
7 (4+3)	39,28 % (22)	0 % (0)	43,75 % (7)	37,5 % (15)
8-9	26,78 % (15)	0 % (0)	0 % (0)	37,5 % (15)
Stade pathologique				
≤pT2a	1,79 % (1)	0 % (0)	6,25 % (1)	0 % (0)
pT2b	3,57 % (2)	0 % (0)	12,5 % (2)	0 % (0)
pT2c	23,21 % (13)	0 % (0)	81,25 % (13)	0 % (0)
pT3a	44,64 % (25)	0 % (0)	0 % (0)	62,5 % (25)
pT3b	26,79 % (15)	0 % (0)	0 % (0)	37,5 % (15)
Ganglion lymphatique				
N0	69,64 % (39)	0 % (0)	87,5 % (14)	62,5 % (25)
N1	21,43 % (12)	0 % (0)	0 % (0)	30 % (12)
Nx	8,93 % (5)	0 % (0)	12,5 % (2)	7,5 % (3)
Marges chirurgicales				
R0	48,21 % (27)	0 % (0)	62,5 % (10)	42,5 % (17)
R1	51,79 % (29)	0 % (0)	37,5 % (6)	57,5 % (23)

() représentent les fréquences des paramètres.

Classification des risques:

¹Risque bas: stade pT1 à pT2a; Score de Gleason ≤ 6; PSA < 10 ng/ml.

²Risque intermédiaire: stade pT2b à pT2c; Score de Gleason de 7; 10 ng/ml < PSA < 20 ng/ml.

³Risque élevé: stade ≥ pT3a; Score de Gleason ≥ 8; PSA > 20 ng/ml.

Immédiatement après ablation de la prostate (délai inférieur à 10 min), des petits morceaux de tissu (au moins 6 échantillons de tissus de 0,5 à 1 cc) ont été disséqués par le pathologiste, dans les zones périphériques gauches et droites, la zone de transition et les vésicules séminales. Tous les fragments ont été congelés et gardés dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse. Pour s'assurer des caractéristiques du tissu et pour confirmer le score de Gleason, une analyse histologique d'une section congelée est réalisée pour chaque échantillon par le pathologiste avant toute extraction. Les fragments entièrement composés de glandes tumorales ont été sélectionnés comme tissu tumoral. D'un autre côté, des échantillons ne contenant pas de tissu tumoral ont été sélectionnés comme tissus sains adjacents.

Tableau 5 : Caractéristiques clinico-pathologiques des échantillons de patients atteints de cancer de la prostate.

N°	Age	Gleason	Stade	pN	Marges	PSA [ng/ml]	IHC
1.	67	3+3	pT2c	N0	R1	15	
2.	72	3+3	pT2c	N0	R0	8,16	+
3.	66	3+4	pT2a	N0	R0	5,64	
4.	60	3+4	pT3a	N0	R0	12,3	
5.	60	3+4	pT3a	N0	R1	9,8	
6.	51	3+4	pT3a	N0	R1	11	+
7.	66	3+4	pT3a	N0	R0	22	
8.	62	3+4	pT2c	N0	R0	4,8	+
9.	49	3+4	pT2c	N0	R1	5	+
10.	63	3+4	pT2c	N0	R0	6,8	+
11.	65	3+4	pT2c	N0	R1	5,35	+
12.	70	3+4	pT3a	N0	R0	9,33	
13.	73	3+4	pT2b	Nx	R1	6,1	+
14.	56	3+4	pT3a	N0	R1	3,83	
15.	53	3+4	pT3a	N0	R1	5,3	+
16.	54	3+4	pT3a	N0	R0	6,6	
17.	68	3+4	pT3a	N0	R1	15,45	+
18.	68	3+4	pT3a	Nx	R0	3,2	
19.	60	3+4	pT2b	N0	R0	7,23	
20.	61	4+3	pT2c	N0	R0	8,8	+
21.	67	4+3	pT3b	N0	R1	18	+
22.	65	4+3	pT3b	N0	R0	11,5	+
23.	57	4+3	pT2c	N0	R0	5,6	
24.	64	4+3	pT2c	N0	R0	4,8	
25.	60	4+3	pT3b	N1	R0	17	
26.	66	4+3	pT2c	N0	R1	7,83	
27.	69	4+3	pT3a	N0	R0	8,3	
28.	60	4+3	pT3b	N1	R1	19,13	+
29.	61	4+3	pT3a	Nx	R1	8,1	
30.	61	4+3	pT2c	N0	R0	4,04	+
31.	59	4+3	pT3a	N0	R1	13,1	+
32.	65	4+3	pT2c	Nx	R1	4,96	
33.	69	4+3	pT3a	N1	R1	6,48	
34.	75	4+3	pT3b	Nx	R0	3,23	
35.	62	4+3	pT3b	N1	R0	197	+
36.	62	4+3	pT3a	N0	R0	13,3	+
37.	57	4+3	pT3a	N0	R0	26	+
38.	60	4+3	pT3b	N0	R0	10	+
39.	70	4+3	pT2c	N0	R0	5,42	
40.	60	4+3	pT3b	N0	R1	7,7	+
41.	60	4+3	pT3b	N0	R1	12,7	+
42.	72	4+5	pT3a	N1	R0	6	
43.	50	5+4	pT3a	N1	R1	8,96	+
44.	64	4+5	pT3a	N1	R1	13	
45.	70	4+4	pT3a	N0	R0	6,33	
46.	71	5+4	pT3a	N1	R1	8,9	+
47.	65	4+4	pT3a	N1	R1	3,36	

N°	Age	Gleason	Stade	pN	Marges	PSA [ng/ml]	IHC
48.	44	4+5	pT3b	N0	R1	44	+
49.	58	4+4	pT3a	N1	R1	14	+
50.	74	4+5	pT3b	N0	R0	nd	+
51.	66	4+5	pT3b	N1	R1	16,8	+
52.	69	4+4	pT3a	N0	R1	10,6	+
53.	51	4+4	pT3b	N0	R0	10,51	+
54.	70	4+4	pT3b	N1	R1	4,35	+
55.	63	4+5	pT3a	N0	R1	4,6	+
56.	65	4+5	pT3b	N0	R1	13,3	+

nd, non déterminé.

Stades pathologiques pT2 et pT3 : tumeur primaire confinée à la prostate ou extension extra-prostatique de la maladie, respectivement. *pT2a*, tumeur unilatérale avec la moitié ou moins d'un lobe touché; *pT2b*, tumeur unilatérale impliquant plus de la moitié d'un lobe; *pT2c*, tumeur bilatérale; *pT3a*, extension extra-prostatique; *pT3b*, invasion des vésicules séminales. *N0*, pas de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux; *N1*, présence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux; *Nx*, ganglions lymphatiques régionaux. non évalués.

R0, marges chirurgicales négatives; *R1*, marges chirurgicales positives.

+, des coupes de 3µm sections ont été réalisées à partir des échantillons de 32 patients pour réaliser une analyse immunohistochimique semi-quantitative. Des tissus cancéreux et non-cancéreux sont présents dans la même coupe de prostate.

BIBLIOGRAPHIE

- Aarnisalo P, Palvimo JJ, Janne OA (1998). CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2122-7.
- Abrahamsson PA (1996). Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Suppl* **6**: 3-8.
- Adler AJ, Scheller A, Hoffman Y, Robins DM (1991). Multiple components of a complex androgen-dependent enhancer. *Mol Endocrinol* **5**: 1587-96.
- Adler AJ, Scheller A, Robins DM (1993). The stringency and magnitude of androgen-specific gene activation are combinatorial functions of receptor and nonreceptor binding site sequences. *Mol Cell Biol* **13**: 6326-35.
- Adolfsson J, Ronstrom L, Lowhagen T, Carstensen J, Hedlund PO (1994). Deferred treatment of clinically localized low grade prostate cancer: the experience from a prospective series at the Karolinska Hospital. *J Urol* **152**: 1757-60.
- Agarwal P, Srivastava R, Srivastava AK, Ali S, Datta M (2013). miR-135a targets IRS2 and regulates insulin signaling and glucose uptake in the diabetic gastrocnemius skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*.
- Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M *et al* (2007). The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* **26**: 6979-88.
- Al-Alwan M, Olabi S, Ghebeh H, Barhoush E, Tulbah A, Al-Tweigeri T *et al* (2011). Fascin is a key regulator of breast cancer invasion that acts via the modification of metastasis-associated molecules. *PLoS One* **6**: e27339.
- Alexiou P, Maragkakis M, Papadopoulos GL, Reczko M, Hatzigeorgiou AG (2009). Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics* **25**: 3049-55.
- Allioli N, Vincent S, Vlaeminck-Guillem V, Decaussin-Petrucci M, Ragage F, Ruffion A *et al* (2011). TM4SF1, a novel primary androgen receptor target gene over-expressed in human prostate cancer and involved in cell migration. *Prostate*.
- Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC (2007). Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem* **282**: 27298-305.
- Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K (2010). Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**: 545-54.

- Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F *et al* (2008). Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res* **68**: 6162-70.
- Ameres SL, Martinez J, Schroeder R (2007). Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell* **130**: 101-12.
- Amine A, Rivera S, Opolon P, Dekkal M, Biard DS, Bouamar H *et al* (2009). Novel anti-metastatic action of cidofovir mediated by inhibition of E6/E7, CXCR4 and Rho/ROCK signaling in HPV tumor cells. *PLoS One* **4**: e5018.
- Amir S, Ma AH, Shi XB, Xue L, Kung HJ, Devere White RW (2013). Oncomir miR-125b Suppresses p14(ARF) to Modulate p53-Dependent and p53-Independent Apoptosis in Prostate Cancer. *PLoS One* **8**: e61064.
- Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR *et al* (2009). Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* **360**: 1310-9.
- Arora S, Rana R, Chhabra A, Jaiswal A, Rani V (2013). miRNA-transcription factor interactions: a combinatorial regulation of gene expression. *Mol Genet Genomics*.
- Auchus ML, Auchus RJ (2012). Human steroid biosynthesis for the oncologist. *J Investig Med* **60**: 495-503.
- Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* **22**: 2773-85.
- Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**: 64-71.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H *et al* (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**: 297-315.
- Bao JJ, Le XF, Wang RY, Yuan J, Wang L, Atkinson EN *et al* (2002). Reexpression of the tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent calpain-dependent pathway. *Cancer Res* **62**: 7264-72.
- Barron N, Keenan J, Gammell P, Martinez VG, Freeman A, Masters JR *et al* (2011). Biochemical relapse following radical prostatectomy and miR-200a levels in prostate cancer. *Prostate* **72**: 1193-9.
- Bartel DP (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**: 215-33.
- Baskerville S, Bartel DP (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* **11**: 241-7.
- Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ (2012). Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* **336**: 233-7.

- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* **20**: 1885-98.
- Benassi B, Flavin R, Marchionni L, Zanata S, Pan Y, Chowdhury D *et al* (2012). MYC is activated by USP2a-mediated modulation of microRNAs in prostate cancer. *Cancer Discov* **2**: 236-47.
- Benten WP, Lieberherr M, Stamm O, Wrehlke C, Guo Z, Wunderlich F (1999). Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol Biol Cell* **10**: 3113-23.
- Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* **28**: 328-36.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-6.
- Berrevoets CA, Doesburg P, Steketee K, Trapman J, Brinkmann AO (1998). Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor2). *Mol Endocrinol* **12**: 1172-83.
- Berrevoets CA, Veldscholte J, Mulder E (1993). Effects of antiandrogens on transformation and transcription activation of wild-type and mutated (LNCaP) androgen receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* **46**: 731-6.
- Bevan CL, Hoare S, Claessens F, Heery DM, Parker MG (1999). The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol Cell Biol* **19**: 8383-92.
- Bhatnagar N, Li X, Padi SK, Zhang Q, Tang MS, Guo B (2010). Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* **1**: e105.
- Bhattacharyya M, Feuerbach L, Bhadra T, Lengauer T, Bandyopadhyay S (2012). MicroRNA transcription start site prediction with multi-objective feature selection. *Stat Appl Genet Mol Biol* **11**: Article 6.
- Boland A, Tritschler F, Heimstadt S, Izaurralde E, Weichenrieder O (2010). Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Rep* **11**: 522-7.
- Boll K, Reiche K, Kasack K, Morbt N, Kretzschmar AK, Tamm JM *et al* (2012). MiR-130a, miR-203 and miR-205 jointly repress key oncogenic pathways and are downregulated in prostate carcinoma. *Oncogene* **32**: 277-85.
- Boll K, Reiche K, Kasack K, Morbt N, Kretzschmar AK, Tamm JM *et al* (2013). MiR-130a, miR-203 and miR-205 jointly repress key oncogenic pathways and are downregulated in prostate carcinoma. *Oncogene* **32**: 277-85.

- Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L *et al* (2008). The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* **14**: 1271-7.
- Bradford TJ, Tomlins SA, Wang X, Chinnaiyan AM (2006). Molecular markers of prostate cancer. *Urol Oncol* **24**: 538-51.
- Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Falth M, Haese A, Steuber T *et al* (2011). Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer* **128**: 608-16.
- Brawer MK (2006). Hormonal therapy for prostate cancer. *Rev Urol* **8 Suppl 2**: S35-47.
- Brenkman AB, van den Broek NJ, de Keizer PL, van Gent DC, Burgering BM (2010). The DNA damage repair protein Ku70 interacts with FOXO4 to coordinate a conserved cellular stress response. *FASEB J* **24**: 4271-80.
- Brooke GN, Bevan CL (2009). The role of androgen receptor mutations in prostate cancer progression. *Curr Genomics* **10**: 18-25.
- Brownawell AM, Macara IG (2002). Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol* **156**: 53-64.
- Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B *et al* (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer* **106**: 768-74.
- Bu Q, Tang HM, Tan J, Hu X, Wang DW (2011). [Expression of RhoC and ROCK-1 and their effects on MAPK and Akt proteins in prostate carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **33**: 202-6.
- Burbelo P, Wellstein A, Pestell RG (2004). Altered Rho GTPase signaling pathways in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **84**: 43-8.
- Butz H, Liko I, Czirjak S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V *et al* (2010). Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **95**: E181-91.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**: 1957-66.
- Carswell BM, Woda BA, Wang X, Li C, Dresser K, Jiang Z (2006). Detection of prostate cancer by alpha-methylacyl CoA racemase (P504S) in needle biopsy specimens previously reported as negative for malignancy. *Histopathology* **48**: 668-73.
- Castoria G, Lombardi M, Barone MV, Bilancio A, Di Domenico M, De Falco A *et al* (2004). Rapid signalling pathway activation by androgens in epithelial and stromal cells. *Steroids* **69**: 517-22.

- Cato AC, Henderson D, Ponta H (1987). The hormone response element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J* **6**: 363-8.
- Chan CH, Lee SW, Li CF, Wang J, Yang WL, Wu CY *et al* (2010). Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* **12**: 457-67.
- Chekulaeva M, Filipowicz W (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 452-60.
- Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R *et al* (2004). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* **10**: 33-9.
- Chen X, Gong J, Zeng H, Chen N, Huang R, Huang Y *et al* (2010). MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression. *Cancer Res* **70**: 2728-38.
- Chen Y, Zaman MS, Deng G, Majid S, Saini S, Liu J *et al* (2011a). MicroRNAs 221/222 and genistein-mediated regulation of ARHI tumor suppressor gene in prostate cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**: 76-86.
- Chen Y, Zhang J, Wang H, Zhao J, Xu C, Du Y *et al* (2012). miRNA-135a promotes breast cancer cell migration and invasion by targeting HOXA10. *BMC Cancer* **12**: 111.
- Chen YJ, Liao CT, Chen PJ, Lee LY, Li YC, Chen IH *et al* (2011b). Downregulation of Ches1 and other novel genes in oral cancer cells chronically exposed to areca nut extract. *Head Neck* **33**: 257-66.
- Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA *et al* (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* **447**: 823-8.
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K *et al* (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**: 740-4.
- Cheng J, Watkins SC, Walker WH (2007). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells. *Endocrinology* **148**: 2066-74.
- Chi SW, Hannon GJ, Darnell RB (2012). An alternative mode of microRNA target recognition. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 321-7.
- Chien CH, Sun YM, Chang WC, Chiang-Hsieh PY, Lee TY, Tsai WC *et al* (2011). Identifying transcriptional start sites of human microRNAs based on high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* **39**: 9345-56.
- Chiyomaru T, Tatarano S, Kawakami K, Enokida H, Yoshino H, Nohata N *et al* (2011). SWAP70, actin-binding protein, function as an oncogene targeting tumor-suppressive miR-145 in prostate cancer. *Prostate*.

- Chodak GW (1994). The role of watchful waiting in the management of localized prostate cancer. *J Urol* **152**: 1766-8.
- Chu CY, Rana TM (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* **4**: e210.
- Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS (2002). Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* **9**: 279-89.
- Claessens F, Denayer S, Van Tilborgh N, Kerkhofs S, Helsen C, Haelens A (2008). Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal* **6**: e008.
- Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G *et al* (2001). Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* **76**: 23-30.
- Clape C, Fritz V, Henriquet C, Apparailly F, Fernandez PL, Iborra F *et al* (2009). miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PLoS One* **4**: e7542.
- Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* **406**: 532-5.
- Clarke MF, Fuller M (2006). Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* **124**: 1111-5.
- Clarke NW (2006). Management of the spectrum of hormone refractory prostate cancer. *Eur Urol* **50**: 428-38; discussion 438-9.
- Clinckemalie L, Vanderschueren D, Boonen S, Claessens F (2012). The hinge region in androgen receptor control. *Mol Cell Endocrinol* **358**: 1-8.
- Coppola V, Musumeci M, Patrizii M, Cannistraci A, Addario A, Maugeri-Sacca M *et al* (2012). BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* **32**: 1843-53.
- Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA (2011). MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* **8**: 467-77.
- Crawford ED (2004). Hormonal therapy in prostate cancer: historical approaches. *Rev Urol* **6 Suppl 7**: S3-S11.
- Crawford ED, Eisenberger MA, McLeod DG, Spaulding JT, Benson R, Dorr FA *et al* (1989). A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *N Engl J Med* **321**: 419-24.

- Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Cato AC, Hittmair A, Radmayr C *et al* (1993). Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol* **7**: 1541-50.
- Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW *et al* (2004). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol* **92**: 221-36.
- D'Antonio JM, Vander Griend DJ, Isaacs JT (2009). DNA licensing as a novel androgen receptor mediated therapeutic target for prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* **16**: 325-32.
- Dahlman-Wright K, Grandien K, Nilsson S, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J (1993). Protein-protein interactions between the DNA-binding domains of nuclear receptors: influence on DNA-binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* **45**: 239-50.
- Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM, Newman M, Erkeland SJ, Hammond SM *et al* (2009). Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO J* **28**: 347-58.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**: 95-105.
- Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* **454**: 56-61.
- Debes JD, Tindall DJ (2004). Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N Engl J Med* **351**: 1488-90.
- Dehm SM, Tindall DJ (2007). Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol* **21**: 2855-63.
- Dehm SM, Tindall DJ (2011). Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocr Relat Cancer* **18**: R183-96.
- del Peso L, Hernandez-Alcoceba R, Embade N, Carnero A, Esteve P, Paje C *et al* (1997). Rho proteins induce metastatic properties in vivo. *Oncogene* **15**: 3047-57.
- Denayer S, Helsen C, Thorrez L, Haelens A, Claessens F (2010). The rules of DNA recognition by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* **24**: 898-913.
- Denis LJ, Griffiths K (2000). Endocrine treatment in prostate cancer. *Semin Surg Oncol* **18**: 52-74.
- Denis LJ, Keuppens F, Smith PH, Whelan P, de Moura JL, Newling D *et al* (1998). Maximal androgen blockade: final analysis of EORTC phase III trial 30853. EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Cooperative Group and the EORTC Data Center. *Eur Urol* **33**: 144-51.
- DeVere White RW, Vinall RL, Tepper CG, Shi XB (2009). MicroRNAs and their potential for translation in prostate cancer. *Urol Oncol* **27**: 307-11.

- di Sant'Agnese PA (1998). Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: an update. *Prostate Suppl* **8**: 74-9.
- Djuranovic S, Zinchenko MK, Hur JK, Nahvi A, Brunelle JL, Rogers EJ *et al* (2010). Allosteric regulation of Argonaute proteins by miRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 144-50.
- Dong Q, Meng P, Wang T, Qin W, Wang F, Yuan J *et al* (2010). MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2. *PLoS One* **5**: e10147.
- Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA (2007). MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* **4**: 721-6.
- Ebert MS, Sharp PA (2010). MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA* **16**: 2043-50.
- Edge SB, Compton CC (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* **17**: 1471-4.
- Edwards J, Krishna NS, Grigor KM, Bartlett JM (2003). Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *Br J Cancer* **89**: 552-6.
- Eeles RA, Kote-Jarai Z, Al Olama AA, Giles GG, Guy M, Severi G *et al* (2009). Identification of seven new prostate cancer susceptibility loci through a genome-wide association study. *Nat Genet* **41**: 1116-21.
- Eisenberger MA, Blumenstein BA, Crawford ED, Miller G, McLeod DG, Loehrer PJ *et al* (1998). Bilateral orchiectomy with or without flutamide for metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* **339**: 1036-42.
- Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL (2005). The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* **29**: 1228-42.
- Erbersdobler A, Augustin H, Schlomm T, Henke RP (2004). Prostate cancers in the transition zone: Part 1; pathological aspects. *BJU Int* **94**: 1221-5.
- Estrada M, Espinosa A, Muller M, Jaimovich E (2003). Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology* **144**: 3586-97.
- Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A, Szabo A, Falcon S, Wegelin J *et al* (2008). Quantifying the role of PSA screening in the US prostate cancer mortality decline. *Cancer Causes Control* **19**: 175-81.
- Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* **15**: 21-32.

- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W (2010a). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* **79**: 351-79.
- Fabian MR, Sundermeier TR, Sonenberg N (2010b). Understanding how miRNAs post-transcriptionally regulate gene expression. *Prog Mol Subcell Biol* **50**: 1-20.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M (2000). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* **52**: 513-56.
- Falkenstein E, Wehling M (2000). Nongenomically initiated steroid actions. *Eur J Clin Invest* **30 Suppl 3**: 51-4.
- Fan X, Chen X, Deng W, Zhong G, Cai Q, Lin T (2013). Up-regulated microRNA-143 in cancer stem cells differentiation promotes prostate cancer cells metastasis by modulating FNDC3B expression. *BMC Cancer* **13**: 61.
- Fendler A, Jung M, Stephan C, Honey RJ, Stewart RJ, Pace KT *et al* (2011). miRNAs can predict prostate cancer biochemical relapse and are involved in tumor progression. *Int J Oncol* **39**: 1183-92.
- Filella X, Foj L, Mila M, Auge JM, Molina R, Jimenez W (2013). PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. *Tumour Biol* **34**: 1337-1347.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**: 102-14.
- Fix C, Jordan C, Cano P, Walker WH (2004). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10919-24.
- Fletcher CE, Dart DA, Sita-Lumsden A, Cheng H, Rennie PS, Bevan CL (2012). Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer. *Hum Mol Genet* **21**: 3112-27.
- Folini M, Gandellini P, Longoni N, Profumo V, Callari M, Pennati M *et al* (2010). miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. *Mol Cancer* **9**: 12.
- Ford OH, 3rd, Gregory CW, Kim D, Smitherman AB, Mohler JL (2003). Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *J Urol* **170**: 1817-21.
- Forman JJ, Legesse-Miller A, Collier HA (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 14879-84.
- Formosa A, Lena AM, Markert EK, Cortelli S, Miano R, Mauriello A *et al* (2013). DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer. *Oncogene* **32**: 127-34.
- Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC *et al* (2005). Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA* **294**: 433-9.

- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**: 92-105.
- Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B (2002). Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* **87**: 635-44.
- Fritz G, Just I, Kaina B (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* **81**: 682-7.
- Fu M, Liu M, Sauve AA, Jiao X, Zhang X, Wu X *et al* (2006). Hormonal control of androgen receptor function through SIRT1. *Mol Cell Biol* **26**: 8122-35.
- Fu M, Rao M, Wang C, Sakamaki T, Wang J, Di Vizio D *et al* (2003). Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Mol Cell Biol* **23**: 8563-75.
- Fujita S, Ito T, Mizutani T, Minoguchi S, Yamamichi N, Sakurai K *et al* (2008). miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol* **378**: 492-504.
- Fujita Y, Kojima K, Ohhashi R, Hamada N, Nozawa Y, Kitamoto A *et al* (2010). MiR-148a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression. *J Biol Chem* **285**: 19076-84.
- Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, Matsumoto T, Koshida I, Yoshimura K *et al* (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol* **9**: 604-11.
- Fuse M, Kojima S, Enokida H, Chiyomaru T, Yoshino H, Nohata N *et al* (2012). Tumor suppressive microRNAs (miR-222 and miR-31) regulate molecular pathways based on microRNA expression signature in prostate cancer. *J Hum Genet* **57**: 691-9.
- Fuse M, Nohata N, Kojima S, Sakamoto S, Chiyomaru T, Kawakami K *et al* (2011). Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1. *Int J Oncol* **38**: 1093-101.
- Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafre SA *et al* (2007). miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* **282**: 23716-24.
- Gandellini P, Folini M, Longoni N, Pennati M, Binda M, Colecchia M *et al* (2009). miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon. *Cancer Res* **69**: 2287-95.
- Gandellini P, Profumo V, Casamichele A, Fenderico N, Borrelli S, Petrovich G *et al* (2012). miR-205 regulates basement membrane deposition in human prostate: implications for cancer development. *Cell Death Differ* **19**: 1750-60.

- Gao N, Zhang J, Rao MA, Case TC, Mirosevich J, Wang Y *et al* (2003). The role of hepatocyte nuclear factor-3 alpha (Forkhead Box A1) and androgen receptor in transcriptional regulation of prostatic genes. *Mol Endocrinol* **17**: 1484-507.
- Garzon R, Marcucci G, Croce CM (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 775-89.
- Gaughan L, Stockley J, Wang N, McCracken SR, Treumann A, Armstrong K *et al* (2011). Regulation of the androgen receptor by SET9-mediated methylation. *Nucleic Acids Res* **39**: 1266-79.
- Gelmann EP (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* **20**: 3001-15.
- Gewirth DT, Sigler PB (1995). The basis for half-site specificity explored through a non-cognate steroid receptor-DNA complex. *Nat Struct Biol* **2**: 386-94.
- Giguere V (2002). To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol Metab* **13**: 220-5.
- Gioeli D, Ficarro SB, Kwiek JJ, Aaronson D, Hancock M, Catling AD *et al* (2002). Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* **277**: 29304-14.
- Gleason DF (1966). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* **50**: 125-8.
- Gleason DF (1992). Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* **23**: 273-9.
- Gomez-Iturriaga Pina A, Crook J, Borg J, Ma C (2010). Biochemical disease-free rate and toxicity for men treated with iodine-125 prostate brachytherapy with d(90) \geq 180 Gy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **78**: 422-7.
- Gong AY, Eischeid AN, Xiao J, Zhao J, Chen D, Wang ZY *et al* (2012). miR-17-5p targets the p300/CBP-associated factor and modulates androgen receptor transcriptional activity in cultured prostate cancer cells. *BMC Cancer* **12**: 492.
- Greco S, De Simone M, Colussi C, Zaccagnini G, Fasanaro P, Pescatori M *et al* (2009). Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J* **23**: 3335-46.
- Green D, Karparkin S (2010). Role of thrombin as a tumor growth factor. *Cell Cycle* **9**: 656-61.
- Green SM, Mostaghel EA, Nelson PS (2012). Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* **360**: 3-13.
- Greene KL, Albertsen PC, Babaian RJ, Carter HB, Gann PH, Han M *et al* (2009). Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *J Urol* **182**: 2232-41.
- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G *et al* (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**: 153-8.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* **123**: 631-40.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N *et al* (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**: 235-40.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* **36**: D154-8.

Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**: 91-105.

Guil S, Caceres JF (2007). The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 591-6.

Gumireddy K, Young DD, Xiong X, Hogenesch JB, Huang Q, Deiters A (2008). Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**: 7482-4.

Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**: 835-40.

Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Doglio A, Bertrand E, Macara IG *et al* (2003). Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem* **278**: 5505-8.

Hagman Z, Larne O, Edsjo A, Bjartell A, Ehrnstrom RA, Ulmert D *et al* (2010). miR-34c is downregulated in prostate cancer and exerts tumor suppressive functions. *Int J Cancer* **127**: 2768-76.

Haile S, Sadar MD (2011). Androgen receptor and its splice variants in prostate cancer. *Cell Mol Life Sci* **68**: 3971-81.

Haley B, Zamore PD (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 599-606.

Ham J, Thomson A, Needham M, Webb P, Parker M (1988). Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus. *Nucleic Acids Res* **16**: 5263-76.

Han G, Buchanan G, Ittmann M, Harris JM, Yu X, Demayo FJ *et al* (2005). Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1151-6.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK *et al* (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **125**: 887-901.

Han J, Pedersen JS, Kwon SC, Belair CD, Kim YK, Yeom KH *et al* (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* **136**: 75-84.

- Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI, Walsh PC (2001). Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am* **28**: 555-65.
- Hard T, Kellenbach E, Boelens R, Maler BA, Dahlman K, Freedman LP *et al* (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* **249**: 157-60.
- Hart M, Wach S, Nolte E, Szczyrba J, Menon R, Taubert H *et al* (2013). The proto-oncogene ERG is a target of microRNA miR-145 in prostate cancer. *FEBS J*.
- He B, Minges JT, Lee LW, Wilson EM (2002). The FXXLF motif mediates androgen receptor-specific interactions with coregulators. *J Biol Chem* **277**: 10226-35.
- He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y *et al* (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* **447**: 1130-4.
- He X, Zhu Z, Johnson C, Stoops J, Eaker AE, Bowen W *et al* (2008). PIK3IP1, a negative regulator of PI3K, suppresses the development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **68**: 5591-8.
- Heemers HV, Tindall DJ (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* **28**: 778-808.
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**: 733-6.
- Heinlein CA, Chang C (2002). The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* **16**: 2181-7.
- Heinlein CA, Chang C (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* **25**: 276-308.
- Hellwinkel OJ, Sellier C, Sylvester YM, Brase JC, Isbarn H, Erbersdobler A *et al* (2013). A Cancer-Indicative microRNA Pattern in Normal Prostate Tissue. *Int J Mol Sci* **14**: 5239-49.
- Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE *et al* (2009). Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol* **7**: e1000238.
- Hidaka H, Seki N, Yoshino H, Yamasaki T, Yamada Y, Nohata N *et al* (2012). Tumor suppressive microRNA-1285 regulates novel molecular targets: aberrant expression and functional significance in renal cell carcinoma. *Oncotarget* **3**: 44-57.
- Hodge JC, Bub J, Kaul S, Kajdacsy-Balla A, Lindholm PF (2003). Requirement of RhoA activity for increased nuclear factor kappaB activity and PC-3 human prostate cancer cell invasion. *Cancer Res* **63**: 1359-64.

- Hoekstra M, van der Lans CA, Halvorsen B, Gullestad L, Kuiper J, Aukrust P *et al* (2010). The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun* **394**: 792-7.
- Horard B, Vanacker JM (2003). Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand. *J Mol Endocrinol* **31**: 349-57.
- Horwich A, Hugosson J, de Reijke T, Wiegel T, Fizazi K, Kataja V (2013). Prostate cancer: ESMO Consensus Conference Guidelines 2012. *Ann Oncol*.
- Hsieh IS, Chang KC, Tsai YT, Ke JY, Lu PJ, Lee KH *et al* (2013). MicroRNA-320 suppresses the stem cell-like characteristics of prostate cancer cells by downregulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Carcinogenesis* **34**: 530-8.
- Hu L, Ibrahim S, Liu C, Skaar J, Pagano M, Karparkin S (2009). Thrombin induces tumor cell cycle activation and spontaneous growth by down-regulation of p27Kip1, in association with the up-regulation of Skp2 and MiR-222. *Cancer Res* **69**: 3374-81.
- Huang S, Guo W, Tang Y, Ren D, Zou X, Peng X (2012). miR-143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells. *Oncol Rep* **28**: 1831-7.
- Huang Y, Zhang JL, Yu XL, Xu TS, Wang ZB, Cheng XC (2013). Molecular functions of small regulatory noncoding RNA. *Biochemistry (Mosc)* **78**: 221-30.
- Huang ZQ, Li J, Sachs LM, Cole PA, Wong J (2003). A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription. *EMBO J* **22**: 2146-55.
- Hudson RS, Yi M, Esposito D, Glynn SA, Starks AM, Yang Y *et al* (2012). MicroRNA-106b-25 cluster expression is associated with early disease recurrence and targets caspase-7 and focal adhesion in human prostate cancer. *Oncogene*.
- Huggins C (1946). Prostatic cancer treated by orchiectomy; the five year results. *J Am Med Assoc* **131**: 576-81.
- Huggins C, Hodges CV (2002). Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol* **167**: 948-51; discussion 952.
- Huggins ML (1941). A New Society for X-Ray and Electron Diffraction Research Workers. *Science* **93**: 489-90.
- Hulf T, Sibbritt T, Wiklund ED, Patterson K, Song JZ, Stirzaker C *et al* (2012). Epigenetic-induced repression of microRNA-205 is associated with MED1 activation and a poorer prognosis in localized prostate cancer. *Oncogene*.
- Hurst DR, Edmonds MD, Welch DR (2009). Metastamir: the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Res* **69**: 7495-8.

- Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* **2**: E98.
- Hwang YS, Hodge JC, Sivapurapu N, Lindholm PF (2006). Lysophosphatidic acid stimulates PC-3 prostate cancer cell Matrigel invasion through activation of RhoA and NF-kappaB activity. *Mol Carcinog* **45**: 518-29.
- Isbarn H, Pinthus JH, Marks LS, Montorsi F, Morales A, Morgentaler A *et al* (2009). Testosterone and prostate cancer: revisiting old paradigms. *Eur Urol* **56**: 48-56.
- Ishteiwy RA, Ward TM, Dykxhoorn DM, Burnstein KL (2012). The microRNA -23b/-27b cluster suppresses the metastatic phenotype of castration-resistant prostate cancer cells. *PLoS One* **7**: e52106.
- Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S (1999). An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* **5**: 221-5.
- Jaaskelainen T, Makkonen H, Visakorpi T, Kim J, Roeder RG, Palvimo JJ (2012). Histone H2B ubiquitin ligases RNF20 and RNF40 in androgen signaling and prostate cancer cell growth. *Mol Cell Endocrinol* **350**: 87-98.
- Jalava SE, Urbanucci A, Latonen L, Waltering KK, Sahu B, Janne OA *et al* (2012). Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene* **31**: 4460-71.
- Jenster G, van der Korput HA, Trapman J, Brinkmann AO (1995). Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem* **270**: 7341-6.
- Jia L, Berman BP, Jariwala U, Yan X, Cogan JP, Walters A *et al* (2008). Genomic androgen receptor-occupied regions with different functions, defined by histone acetylation, coregulators and transcriptional capacity. *PLoS One* **3**: e3645.
- Jin XF, Wu N, Wang L, Li J (2013). Circulating MicroRNAs: A Novel Class of Potential Biomarkers for Diagnosing and Prognosing Central Nervous System Diseases. *Cell Mol Neurobiol* **33**: 601-13.
- Johansson JE (1994). Watchful waiting for early stage prostate cancer. *Urology* **43**: 138-42.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A *et al* (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**: 635-47.
- Joly-Pharaboz MO, Ruffion A, Roch A, Michel-Calemard L, Andre J, Chantepie J *et al* (2000). Inhibition of growth and induction of apoptosis by androgens of a variant of LNCaP cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* **73**: 237-49.
- Jopling CL, Schutz S, Sarnow P (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* **4**: 77-85.

- Kaku N, Matsuda K, Tsujimura A, Kawata M (2008). Characterization of nuclear import of the domain-specific androgen receptor in association with the importin alpha/beta and Ran-guanosine 5'-triphosphate systems. *Endocrinology* **149**: 3960-9.
- Kamai T, Kawakami S, Koga F, Arai G, Takagi K, Arai K *et al* (2003). RhoA is associated with invasion and lymph node metastasis in upper urinary tract cancer. *BJU Int* **91**: 234-8.
- Kasahara K, Taguchi T, Yamasaki I, Kamada M, Yuri K, Shuin T (2002). Detection of genetic alterations in advanced prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **137**: 59-63.
- Kashat M, Azzouz L, Sarkar SH, Kong D, Li Y, Sarkar FH (2012). Inactivation of AR and Notch-1 signaling by miR-34a attenuates prostate cancer aggressiveness. *Am J Transl Res* **4**: 432-42.
- Kasper S, Rennie PS, Bruchovsky N, Sheppard PC, Cheng H, Lin L *et al* (1994). Cooperative binding of androgen receptors to two DNA sequences is required for androgen induction of the probasin gene. *J Biol Chem* **269**: 31763-9.
- Kaufmann E, Knochel W (1996). Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* **57**: 3-20.
- Kehlenbach RH, Dickmanns A, Kehlenbach A, Guan T, Gerace L (1999). A role for RanBP1 in the release of CRM1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export. *J Cell Biol* **145**: 645-57.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**: 209-16.
- Kim K, Chadalapaka G, Pathi SS, Jin UH, Lee JS, Park YY *et al* (2012). Induction of the transcriptional repressor ZBTB4 in prostate cancer cells by drug-induced targeting of microRNA-17-92/106b-25 clusters. *Mol Cancer Ther* **11**: 1852-62.
- Kim T, Reitmair A (2013). Non-Coding RNAs: Functional Aspects and Diagnostic Utility in Oncology. *Int J Mol Sci* **14**: 4934-68.
- Kim VN, Han J, Siomi MC (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 126-39.
- Knudsen KE, Arden KC, Cavenee WK (1998). Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *J Biol Chem* **273**: 20213-22.
- Knudsen KE, Penning TM (2010). Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab* **21**: 315-24.
- Ko S, Ahn J, Song CS, Kim S, Knapczyk-Stwora K, Chatterjee B (2011). Lysine methylation and functional modulation of androgen receptor by Set9 methyltransferase. *Mol Endocrinol* **25**: 433-44.

- Kobayashi N, Uemura H, Nagahama K, Okudela K, Furuya M, Ino Y *et al* (2012). Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. *Oncotarget* **3**: 1455-71.
- Koh CM, Iwata T, Zheng Q, Bethel C, Yegnasubramanian S, De Marzo AM (2011). Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget* **2**: 669-83.
- Kojima K, Fujita Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M (2010). MiR-34a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms. *Prostate* **70**: 1501-12.
- Kojima S, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nohata N *et al* (2012). Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer. *Br J Cancer* **106**: 405-13.
- Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Wang Z, Sethi S *et al* (2010). Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS One* **5**: e12445.
- Kong D, Li Y, Wang Z, Banerjee S, Ahmad A, Kim HR *et al* (2009). miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells. *Stem Cells* **27**: 1712-21.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* **11**: 597-610.
- Krutovskikh VA, Herceg Z (2010). Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers. *Bioessays* **32**: 894-904.
- Lal A, Navarro F, Maher CA, Maliszewski LE, Yan N, O'Day E *et al* (2009). miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell* **35**: 610-25.
- Lane J, Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG (2008). The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer. *Int J Oncol* **33**: 585-93.
- Lawson DA, Zong Y, Memarzadeh S, Xin L, Huang J, Witte ON (2010). Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2610-5.
- Lee J, Li Z, Brower-Sinning R, John B (2007). Regulatory circuit of human microRNA biogenesis. *PLoS Comput Biol* **3**: e67.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J *et al* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**: 415-9.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* **21**: 4663-70.

- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH *et al* (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**: 4051-60.
- Leibowitz-Amit R, Joshua AM (2012). Targeting the androgen receptor in the management of castration-resistant prostate cancer: rationale, progress, and future directions. *Curr Oncol* **19**: S22-31.
- Leite KR, Canavez JM, Reis ST, Tomiyama AH, Piantino CB, Sanudo A *et al* (2011). miRNA analysis of prostate cancer by quantitative real time PCR: comparison between formalin-fixed paraffin embedded and fresh-frozen tissue. *Urol Oncol* **29**: 533-7.
- Leite KR, Sousa-Canavez JM, Reis ST, Tomiyama AH, Camara-Lopes LH, Sanudo A *et al* (2009). Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis. *Urol Oncol* **29**: 265-9.
- Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, Martinez J (2006). Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* **7**: 314-20.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15-20.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**: 787-98.
- Li B, Shi XB, Nori D, Chao CK, Chen AM, Valicenti R *et al* (2011). Down-regulation of microRNA 106b is involved in p21-mediated cell cycle arrest in response to radiation in prostate cancer cells. *Prostate* **71**: 567-74.
- Li Q, Li X, Guo Z, Xu F, Xia J, Liu Z *et al* (2012a). MicroRNA-574-5p was pivotal for TLR9 signaling enhanced tumor progression via down-regulating checkpoint suppressor 1 in human lung cancer. *PLoS One* **7**: e48278.
- Li X, Pan JH, Song B, Xiong EQ, Chen ZW, Zhou ZS *et al* (2012b). Suppression of CX43 expression by miR-20a in the progression of human prostate cancer. *Cancer Biol Ther* **13**: 890-8.
- Li Y, Kong D, Ahmad A, Bao B, Dyson G, Sarkar FH (2012c). Epigenetic deregulation of miR-29a and miR-1256 by isoflavone contributes to the inhibition of prostate cancer cell growth and invasion. *Epigenetics* **7**: 940-9.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J *et al* (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**: 769-73.
- Lin D, Cui F, Bu Q, Yan C (2011). The expression and clinical significance of GTP-binding RAS-like 3 (ARHI) and microRNA 221 and 222 in prostate cancer. *J Int Med Res* **39**: 1870-5.
- Lin PC, Chiu YL, Banerjee S, Park K, Mosquera JM, Giannopoulou E *et al* (2012). Epigenetic repression of miR-31 disrupts androgen receptor homeostasis and contributes to prostate cancer progression. *Cancer Res* **73**: 1232-44.

- Lin SL, Chang D, Ying SY (2007). Hyaluronan stimulates transformation of androgen-independent prostate cancer. *Carcinogenesis* **28**: 310-20.
- Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY (2008). Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA* **14**: 417-24.
- Lindner U, Trachtenberg J, Lawrentschuk N (2010). Focal therapy in prostate cancer: modalities, findings and future considerations. *Nat Rev Urol* **7**: 562-71.
- Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 576-7.
- Linja MJ, Savinainen KJ, Saramaki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T (2001). Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* **61**: 3550-5.
- Link KA, Balasubramaniam S, Sharma A, Comstock CE, Godoy-Tundidor S, Powers N *et al* (2008). Targeting the BAF57 SWI/SNF subunit in prostate cancer: a novel platform to control androgen receptor activity. *Cancer Res* **68**: 4551-8.
- Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H *et al* (2011a). The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* **17**: 211-5.
- Liu C, Kelnar K, Vlassov AV, Brown D, Wang J, Tang DG (2012a). Distinct microRNA expression profiles in prostate cancer stem/progenitor cells and tumor-suppressive functions of let-7. *Cancer Res* **72**: 3393-404.
- Liu C, Tang DG (2011). MicroRNA regulation of cancer stem cells. *Cancer Res* **71**: 5950-4.
- Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y *et al* (2011b). MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1alpha expression. *PLoS One* **6**: e19139.
- Liu P, Li S, Gan L, Kao TP, Huang H (2008). A transcription-independent function of FOXO1 in inhibition of androgen-independent activation of the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res* **68**: 10290-9.
- Liu S, Guo W, Shi J, Li N, Yu X, Xue J *et al* (2011c). MicroRNA-135a contributes to the development of portal vein tumor thrombus by promoting metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **56**: 389-96.
- Liu X, Choy E, Hornicek FJ, Yang S, Yang C, Harmon D *et al* (2011d). ROCK1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma. *J Orthop Res* **29**: 1259-66.
- Liu YN, Abou-Kheir W, Yin JJ, Fang L, Hynes P, Casey O *et al* (2012b). Critical and reciprocal regulation of KLF4 and SLUG in transforming growth factor beta-initiated prostate cancer epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* **32**: 941-53.

- Liu YN, Yin JJ, Abou-Kheir W, Hynes PG, Casey OM, Fang L *et al* (2012c). MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms. *Oncogene* **32**: 296-306.
- Lochhead PA, Wickman G, Mezna M, Olson MF (2010). Activating ROCK1 somatic mutations in human cancer. *Oncogene* **29**: 2591-8.
- Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Korner H *et al* (2008). Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* **7**: 2591-600.
- Lonergan PE, Tindall DJ (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog* **10**: 20.
- Long Q, Johnson BA, Osunkoya AO, Lai YH, Zhou W, Abramovitz M *et al* (2011). Protein-coding and microRNA biomarkers of recurrence of prostate cancer following radical prostatectomy. *Am J Pathol* **179**: 46-54.
- Long RM, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW (2005). Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin Sci (Lond)* **108**: 1-11.
- Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH *et al* (2008). MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* **27**: 4373-9.
- Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM (1988). Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* **240**: 327-30.
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**: 95-8.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9667-72.
- Ma H, Hong H, Huang SM, Irvine RA, Webb P, Kushner PJ *et al* (1999). Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. *Mol Cell Biol* **19**: 6164-73.
- Ma JB, Ye K, Patel DJ (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* **429**: 318-22.
- Ma S, Chan YP, Kwan PS, Lee TK, Yan M, Tang KH *et al* (2011). MicroRNA-616 induces androgen-independent growth of prostate cancer cells by suppressing expression of tissue factor pathway inhibitor TFPI-2. *Cancer Res* **71**: 583-92.
- MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 512-7.

- Magnani L, Eeckhoutte J, Lupien M (2011). Pioneer factors: directing transcriptional regulators within the chromatin environment. *Trends Genet* **27**: 465-74.
- Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J (2011). Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology* **77**: 1265 e9-16.
- Majid S, Dar AA, Saini S, Shahryari V, Arora S, Zaman MS *et al* (2013). miRNA-34b inhibits prostate cancer through demethylation, active chromatin modifications, and AKT pathways. *Clin Cancer Res* **19**: 73-84.
- Majid S, Dar AA, Saini S, Yamamura S, Hirata H, Tanaka Y *et al* (2010). MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer* **116**: 5637-49.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K *et al* (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**: 835-9.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY *et al* (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**: 704-15.
- Maniataki E, Mourelatos Z (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* **19**: 2979-90.
- Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1102-7.
- Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S *et al* (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* **134**: 521-33.
- Martens-Uzunova ES, Jalava SE, Dits NF, van Leenders GJ, Moller S, Trapman J *et al* (2012). Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene* **31**: 978-91.
- Massie CE, Adryan B, Barbosa-Morais NL, Lynch AG, Tran MG, Neal DE *et al* (2007). New androgen receptor genomic targets show an interaction with the ETS1 transcription factor. *EMBO Rep* **8**: 871-8.
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T *et al* (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* **317**: 1764-7.
- Mavridis K, Stravodimos K, Scorilas A (2013). Downregulation and prognostic performance of microRNA 224 expression in prostate cancer. *Clin Chem* **59**: 261-9.
- McCarthy N (2011). Prostate cancer: Studying the classics. *Nat Rev Cancer* **11**: 386.

- McEwan IJ, Gustafsson J (1997). Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8485-90.
- McKenna NJ, Cooney AJ, DeMayo FJ, Downes M, Glass CK, Lanz RB *et al* (2009). Minireview: Evolution of NURSA, the Nuclear Receptor Signaling Atlas. *Mol Endocrinol* **23**: 740-6.
- McNeal JE (1981). Normal and pathologic anatomy of prostate. *Urology* **17**: 11-6.
- Medina PP, Nolde M, Slack FJ (2010). OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* **467**: 86-90.
- Megraw M, Baev V, Rusinov V, Jensen ST, Kalantidis K, Hatzigeorgiou AG (2006). MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. *RNA* **12**: 1612-9.
- Melo S, Villanueva A, Moutinho C, Davalos V, Spizzo R, Ivan C *et al* (2011). Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4394-9.
- Melo SA, Ropero S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA *et al* (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet* **41**: 365-70.
- Mercatelli N, Coppola V, Bonci D, Miele F, Costantini A, Guadagnoli M *et al* (2008). The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PLoS One* **3**: e4029.
- Michels G, Hoppe UC (2008). Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* **29**: 182-98.
- Mihelich BL, Khramtsova EA, Arva N, Vaishnav A, Johnson DN, Giangreco AA *et al* (2011). miR-183-96-182 cluster is overexpressed in prostate tissue and regulates zinc homeostasis in prostate cells. *J Biol Chem* **286**: 44503-11.
- Miller WL (1998). Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **12**: 67-81.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL *et al* (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10513-8.
- Moehren U, Denayer S, Podvinec M, Verrijdt G, Claessens F (2008). Identification of androgen-selective androgen-response elements in the human aquaporin-5 and Rad9 genes. *Biochem J* **411**: 679-86.
- Moltzahn F, Olshen AB, Baehner L, Peek A, Fong L, Stoppler H *et al* (2011). Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Res* **71**: 550-60.

- Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG (1987). Biological actions of androgens. *Endocr Rev* **8**: 1-28.
- Moore RL, Dai Y, Faller DV (2012). Sirtuin 1 (SIRT1) and steroid hormone receptor activity in cancer. *J Endocrinol* **213**: 37-48.
- Moras D, Gronemeyer H (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 384-91.
- Morgan-Fisher M, Wewer UM, Yoneda A (2013). Regulation of ROCK Activity in Cancer. *J Histochem Cytochem* **61**: 185-98.
- Morgentaler A (2006). Testosterone and prostate cancer: an historical perspective on a modern myth. *Eur Urol* **50**: 935-9.
- Morgentaler A, Traish AM (2009). Shifting the paradigm of testosterone and prostate cancer: the saturation model and the limits of androgen-dependent growth. *Eur Urol* **55**: 310-20.
- Morlando M, Ballarino M, Gromak N, Pagano F, Bozzoni I, Proudfoot NJ (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 902-9.
- Moul JW, Wu H, Sun L, McLeod DG, Amling C, Donahue T *et al* (2004). Early versus delayed hormonal therapy for prostate specific antigen only recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* **171**: 1141-7.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L *et al* (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* **16**: 720-8.
- Mukherji D, Eichholz A, De Bono JS (2012). Management of metastatic castration-resistant prostate cancer: recent advances. *Drugs* **72**: 1011-28.
- Murata T, Takayama K, Katayama S, Urano T, Horie-Inoue K, Ikeda K *et al* (2010). miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **13**: 356-61.
- Musumeci M, Coppola V, Addario A, Patrizii M, Maugeri-Sacca M, Memeo L *et al* (2011). Control of tumor and microenvironment cross-talk by miR-15a and miR-16 in prostate cancer. *Oncogene* **30**: 4231-42.
- Nadiminty N, Tummala R, Lou W, Zhu Y, Zhang J, Chen X *et al* (2012). MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of Myc expression in prostate cancer cells. *J Biol Chem* **287**: 1527-37.
- Nagel R, le Sage C, Diosdado B, van der Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A *et al* (2008). Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res* **68**: 5795-802.
- Narayanan R, Jiang J, Gusev Y, Jones A, Kearbey JD, Miller DD *et al* (2010). MicroRNAs are mediators of androgen action in prostate and muscle. *PLoS One* **5**: e13637.

- Navarro A, Diaz T, Martinez A, Gaya A, Pons A, Gel B *et al* (2009). Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* **114**: 2945-51.
- Navon R, Wang H, Steinfeld I, Tsalenko A, Ben-Dor A, Yakhini Z (2009). Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types. *PLoS One* **4**: e8003.
- Neilson JR, Zheng GX, Burge CB, Sharp PA (2007). Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev* **21**: 578-89.
- Nelson JB, Lepor H (2003). Prostate cancer: radical prostatectomy. *Urol Clin North Am* **30**: 703-23, viii.
- Nguyen HC, Xie W, Yang M, Hsieh CL, Drouin S, Lee GS *et al* (2013). Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *Prostate* **73**: 346-54.
- Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB (2007). Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* **13**: 1894-910.
- Noonan EJ, Place RF, Pookot D, Basak S, Whitson JM, Hirata H *et al* (2009). miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene* **28**: 1714-24.
- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1108-14.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* **435**: 839-43.
- Obad S, dos Santos CO, Petri A, Heidenblad M, Broom O, Ruse C *et al* (2011). Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet* **43**: 371-8.
- Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, Martinez J (2006). Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA* **12**: 1161-7.
- Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Ikeda K, Horie-Inoue K *et al* (2012). ARFGAP3, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Int J Cancer* **130**: 2240-8.
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* **130**: 89-100.
- Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 354-63.
- Olsen PH, Ambros V (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* **216**: 671-80.

- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**: 1354-7.
- Orom UA, Nielsen FC, Lund AH (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* **30**: 460-71.
- Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robson CN (2000). Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol Endocrinol* **14**: 1618-26.
- Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* **27**: 1788-93.
- Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG *et al* (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* **22**: 3172-83.
- Pang RT, Liu WM, Leung CO, Ye TM, Kwan PC, Lee KF *et al* (2011). miR-135A regulates preimplantation embryo development through down-regulation of E3 Ubiquitin Ligase Seven In Absentia Homolog 1A (SIAH1A) expression. *PLoS One* **6**: e27878.
- Pati D, Keller C, Groudine M, Plon SE (1997). Reconstitution of a MEC1-independent checkpoint in yeast by expression of a novel human fork head cDNA. *Mol Cell Biol* **17**: 3037-46.
- Patron JP, Fendler A, Bild M, Jung U, Muller H, Arntzen MO *et al* (2012). MiR-133b targets antiapoptotic genes and enhances death receptor-induced apoptosis. *PLoS One* **7**: e35345.
- Peng X, Guo W, Liu T, Wang X, Tu X, Xiong D *et al* (2011). Identification of miRs-143 and -145 that is associated with bone metastasis of prostate cancer and involved in the regulation of EMT. *PLoS One* **6**: e20341.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* **21**: 533-42.
- Petracco R, Grechukhina O, Popkhadze S, Massasa E, Zhou Y, Taylor HS (2011). MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* **96**: E1925-33.
- Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI (2013). Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int*.
- Pierrou S, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerback S, Carlsson P (1994). Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *EMBO J* **13**: 5002-12.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E *et al* (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**: 1573-6.

- Poliseno L, Salmena L, Riccardi L, Fornari A, Song MS, Hobbs RM *et al* (2010). Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Sci Signal* **3**: ra29.
- Porkka KP, Ogg EL, Saramaki OR, Vessella RL, Pukkila H, Lahdesmaki H *et al* (2011). The miR-15a-miR-16-1 locus is homozygously deleted in a subset of prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer* **50**: 499-509.
- Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T (2007). MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* **67**: 6130-5.
- Pratt WB, Toft DO (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* **18**: 306-60.
- Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P *et al* (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 973-8.
- Puhr M, Hoefer J, Schafer G, Erb HH, Oh SJ, Klocker H *et al* (2012). Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205. *Am J Pathol* **181**: 2188-201.
- Qu Y, Li WC, Hellem MR, Rostad K, Popa M, McCormack E *et al* (2013). MiR-182 and miR-203 induce mesenchymal to epithelial transition and self-sufficiency of growth signals via repressing SNAI2 in prostate cells. *Int J Cancer* **133**: 544-55.
- Ramberg H, Alshbib A, Berge V, Svindland A, Tasken KA (2011). Regulation of PBX3 expression by androgen and Let-7d in prostate cancer. *Mol Cancer* **10**: 50.
- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* **123**: 621-9.
- Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I (2006). Rho/ROCK pathway as a target of tumor therapy. *J Neurosci Res* **83**: 243-55.
- Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* **11**: 1640-7.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE *et al* (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**: 901-6.
- Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, Dall'Oglio MF, Dip N, Passerotti CC *et al* (2012). miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer. *BMC Urol* **12**: 14.
- Rennie PS, Bruchovsky N, Leco KJ, Sheppard PC, McQueen SA, Cheng H *et al* (1993). Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Mol Endocrinol* **7**: 23-36.

- Reshmi G, Pillai MR (2008). Beyond HPV: oncomirs as new players in cervical cancer. *FEBS Lett* **582**: 4113-6.
- Revelli A, Tesarik J, Massobrio M (1998). Nongenomic effects of neurosteroids. *Gynecol Endocrinol* **12**: 61-7.
- Ribas J, Ni X, Haffner M, Wentzel EA, Salmasi AH, Chowdhury WH *et al* (2009). miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res* **69**: 7165-9.
- Riegman PH, Vlietstra RJ, van der Korput JA, Brinkmann AO, Trapman J (1991). The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol Endocrinol* **5**: 1921-30.
- Riento K, Ridley AJ (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 446-56.
- Rizzo S, Attard G, Hudson DL (2005). Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif* **38**: 363-74.
- Roach M, 3rd, Hanks G, Thames H, Jr., Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH *et al* (2006). Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **65**: 965-74.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**: 1902-10.
- Roesch A, Mueller AM, Stempfl T, Moehle C, Landthaler M, Vogt T (2008). RBP2-H1/JARID1B is a transcriptional regulator with a tumor suppressive potential in melanoma cells. *Int J Cancer* **122**: 1047-57.
- Rokhlin OW, Scheinker VS, Taghiyev AF, Bumcrot D, Glover RA, Cohen MB (2008). MicroRNA-34 mediates AR-dependent p53-induced apoptosis in prostate cancer. *Cancer Biol Ther* **7**: 1288-96.
- Rosenthal SA, Sandler HM (2010). Treatment strategies for high-risk locally advanced prostate cancer. *Nat Rev Urol* **7**: 31-8.
- Rosner W (1991). Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* **20**: 697-720.
- Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA (1999a). Androgen and estrogen signaling at the cell membrane via G-proteins and cyclic adenosine monophosphate. *Steroids* **64**: 100-6.
- Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA (1999b). Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**: 481-5.

- Routhier A, Astuccio M, Lahey D, Monfredo N, Johnson A, Callahan W *et al* (2010). Pharmacological inhibition of Rho-kinase signaling with Y-27632 blocks melanoma tumor growth. *Oncol Rep* **23**: 861-7.
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448**: 83-6.
- Sahu B, Laakso M, Ovaska K, Mirtti T, Lundin J, Rannikko A *et al* (2011). Dual role of FoxA1 in androgen receptor binding to chromatin, androgen signalling and prostate cancer. *EMBO J* **30**: 3962-76.
- Saini HK, Enright AJ, Griffiths-Jones S (2008). Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC Genomics* **9**: 564.
- Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 17719-24.
- Saini S, Majid S, Shahryari V, Arora S, Yamamura S, Chang I *et al* (2012). miRNA-708 control of CD44(+) prostate cancer-initiating cells. *Cancer Res* **72**: 3618-30.
- Saini S, Majid S, Yamamura S, Tabatabai L, Suh SO, Shahryari V *et al* (2011). Regulatory Role of mir-203 in Prostate Cancer Progression and Metastasis. *Clin Cancer Res* **17**: 5287-98.
- Saporita AJ, Zhang Q, Navai N, Dincer Z, Hahn J, Cai X *et al* (2003). Identification and characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor. *J Biol Chem* **278**: 41998-2005.
- Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F *et al* (2009). Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer* **126**: 1166-76.
- Schirle NT, MacRae IJ (2012). The crystal structure of human Argonaute2. *Science* **336**: 1037-40.
- Schmitter D, Cotter G, Voors AA (2013). Clinical use of novel biomarkers in heart failure: towards personalized medicine. *Heart Fail Rev*.
- Schoenmakers E, Alen P, Verrijdt G, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W *et al* (1999). Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains. *Biochem J* **341** (Pt 3): 515-21.
- Schrijvers D, Van Erps P, Cortvriend J (2010). Castration-refractory prostate cancer: New drugs in the pipeline. *Adv Ther* **27**: 285-96.
- Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V *et al* (2009). Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* **360**: 1320-8.

- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**: 199-208.
- Scott KL, Plon SE (2005). CHES1/FOXN3 interacts with Ski-interacting protein and acts as a transcriptional repressor. *Gene* **359**: 119-26.
- Sekiya T, Muthurajan UM, Luger K, Tulin AV, Zaret KS (2009). Nucleosome-binding affinity as a primary determinant of the nuclear mobility of the pioneer transcription factor FoxA. *Genes Dev* **23**: 804-9.
- Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**: 58-63.
- Serandour AA, Avner S, Percevault F, Demay F, Bizot M, Lucchetti-Miganeh C *et al* (2011). Epigenetic switch involved in activation of pioneer factor FOXA1-dependent enhancers. *Genome Res* **21**: 555-65.
- Shalev E, Leung PC (2003). Gonadotropin-releasing hormone and reproductive medicine. *J Obstet Gynaecol Can* **25**: 98-113.
- Shi GH, Ye DW, Yao XD, Zhang SL, Dai B, Zhang HL *et al* (2010). Involvement of microRNA-21 in mediating chemo-resistance to docetaxel in androgen-independent prostate cancer PC3 cells. *Acta Pharmacol Sin* **31**: 867-73.
- Shi XB, Xue L, Ma AH, Tepper CG, Gandour-Edwards R, Kung HJ *et al* (2012). Tumor suppressive miR-124 targets androgen receptor and inhibits proliferation of prostate cancer cells. *Oncogene*.
- Shi XB, Xue L, Ma AH, Tepper CG, Kung HJ, White RW (2011). miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes. *Prostate* **71**: 538-49.
- Shi XB, Xue L, Yang J, Ma AH, Zhao J, Xu M *et al* (2007). An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19983-8.
- Shiota M, Yokomizo A, Fujimoto N, Kuruma H, Naito S (2013). Castration-resistant Prostate Cancer: Novel Therapeutics Pre- or Post- Taxane Administration. *Curr Cancer Drug Targets* **13**: 444-59.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **62**: 10-29.
- Sikand K, Slaibi JE, Singh R, Slane SD, Shukla GC (2011). miR 488* inhibits androgen receptor expression in prostate carcinoma cells. *Int J Cancer* **129**: 810-9.
- Simental JA, Sar M, Lane MV, French FS, Wilson EM (1991). Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* **266**: 510-8.

- Slabakova E, Pernicova Z, Slavickova E, Starsichova A, Kozubik A, Soucek K (2011). TGF-beta1-induced EMT of non-transformed prostate hyperplasia cells is characterized by early induction of SNAI2/Slug. *Prostate* **71**: 1332-43.
- Sladek R, Bader JA, Giguere V (1997). The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol* **17**: 5400-9.
- Small EJ, Roach M, 3rd (2002). Prostate-specific antigen in prostate cancer: a case study in the development of a tumor marker to monitor recurrence and assess response. *Semin Oncol* **29**: 264-73.
- Smith DF, Toft DO (2008). Minireview: the intersection of steroid receptors with molecular chaperones: observations and questions. *Mol Endocrinol* **22**: 2229-40.
- Smith JA, Jr., Lange PH, Janknegt RA, Abbou CC, deGery A (1997). Serum markers as a predictor of response duration and patient survival after hormonal therapy for metastatic carcinoma of the prostate. *J Urol* **157**: 1329-34.
- Sober S, Laan M, Annilo T (2010). MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. *Biochem Biophys Res Commun* **391**: 727-32.
- Somjen D, Kohen F, Gayer B, Kulik T, Knoll E, Stern N (2004). Role of putative membrane receptors in the effect of androgens on human vascular cell growth. *J Endocrinol* **180**: 97-106.
- Somlyo AV, Bradshaw D, Ramos S, Murphy C, Myers CE, Somlyo AP (2000). Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **269**: 652-9.
- Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA *et al* (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* **10**: 1026-32.
- Sotillo E, Thomas-Tikhonenko A (2011). Shielding the messenger (RNA): microRNA-based anticancer therapies. *Pharmacol Ther* **131**: 18-32.
- Soulie M, Barre C, Beuzeboc P, Chautard D, Cornud F, Eschwege P *et al* (2004). [Prostatic cancer]. *Prog Urol* **14**: 913, 915-55.
- Spahn M, Kneitz S, Scholz CJ, Stenger N, Rudiger T, Strobel P *et al* (2010). Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence. *Int J Cancer* **127**: 394-403.
- Spencer C, Montalvo J, McLaughlin SR, Bryan BA (2011). Small molecule inhibition of cytoskeletal dynamics in melanoma tumors results in altered transcriptional expression patterns of key genes involved in tumor initiation and progression. *Cancer Genomics Proteomics* **8**: 77-85.

- Strigley JR, Amin M, Boccon-Gibod L, Egevad L, Epstein JI, Humphrey PA *et al* (2005). Prognostic and predictive factors in prostate cancer: historical perspectives and recent international consensus initiatives. *Scand J Urol Nephrol Suppl*: 8-19.
- Strigley JR, Delahunt B, Evans AJ (2012). Therapy-associated effects in the prostate gland. *Histopathology* **60**: 153-65.
- Stanbrough M, Leav I, Kwan PW, Bubley GJ, Balk SP (2001). Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10823-8.
- Steineck G, Helgesen F, Adolfsson J, Dickman PW, Johansson JE, Norlen BJ *et al* (2002). Quality of life after radical prostatectomy or watchful waiting. *N Engl J Med* **347**: 790-6.
- Stenvang J, Petri A, Lindow M, Obad S, Kauppinen S (2012). Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence* **3**: 1.
- Stenvang J, Silahatoglu AN, Lindow M, Elmen J, Kauppinen S (2008). The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics. *Semin Cancer Biol* **18**: 89-102.
- Stewart CJ, Crook M, Loi S (2012). Fascin expression in endocervical neoplasia: correlation with tumour morphology and growth pattern. *J Clin Pathol* **65**: 213-7.
- Suh SO, Chen Y, Zaman MS, Hirata H, Yamamura S, Shahryari V *et al* (2011). MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis* **32**: 772-8.
- Sun D, Lauer R, Mueller AC, Cichewicz MA, Negishi M, Paschal BM *et al* (2013). Regulation of several androgen-induced genes through the repression of the miR-99a/let-7c/miR-125b-2 miRNA cluster in prostate cancer cells. *Oncogene*.
- Sun D, Lee YS, Malhotra A, Kim HK, Matecic M, Evans C *et al* (2011). miR-99 family of MicroRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res* **71**: 1313-24.
- Sun T, Wang Q, Balk S, Brown M, Lee GS, Kantoff P (2009). The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Cancer Res* **69**: 3356-63.
- Sun T, Yang M, Chen S, Balk S, Pomerantz M, Hsieh CL *et al* (2012). The altered expression of MiR-221/-222 and MiR-23b/-27b is associated with the development of human castration resistant prostate cancer. *Prostate* **72**: 1093-103.
- Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* **460**: 529-33.
- Szczyrba J, Loprich E, Wach S, Jung V, Unteregger G, Barth S *et al* (2010). The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Mol Cancer Res* **8**: 529-38.

- Takayama K, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Murakami K, Hayashizaki Y *et al* (2008). FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **374**: 388-93.
- Takayama K, Tsutsumi S, Katayama S, Okayama T, Horie-Inoue K, Ikeda K *et al* (2011). Integration of cap analysis of gene expression and chromatin immunoprecipitation analysis on array reveals genome-wide androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Oncogene* **30**: 619-30.
- Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N *et al* (2010). Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther* **18**: 181-7.
- Tan J, Sharief Y, Hamil KG, Gregory CW, Zang DY, Sar M *et al* (1997). Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Mol Endocrinol* **11**: 450-9.
- Tanner T, Claessens F, Haelens A (2004). The hinge region of the androgen receptor plays a role in proteasome-mediated transcriptional activation. *Ann N Y Acad Sci* **1030**: 587-92.
- Tao J, Wu D, Xu B, Qian W, Li P, Lu Q *et al* (2012). microRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells by targeting the epidermal growth factor receptor. *Oncol Rep* **27**: 1967-75.
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **455**: 1124-8.
- Taylor RA, Toivanen R, Risbridger GP (2010). Stem cells in prostate cancer: treating the root of the problem. *Endocr Relat Cancer* **17**: R273-85.
- Teyssier C, Bianco S, Lanvin O, Vanacker JM (2008). The orphan receptor ERRalpha interferes with steroid signaling. *Nucleic Acids Res* **36**: 5350-61.
- Thermann R, Hentze MW (2007). Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* **447**: 875-8.
- Thiery JP (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 442-54.
- Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL *et al* (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* **350**: 2239-46.
- Tie J, Fan D (2011). Big roles of microRNAs in tumorigenesis and tumor development. *Histol Histopathol* **26**: 1353-61.
- Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE *et al* (2008). Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* **10**: 177-88.

- Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S *et al* (2009). MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther* **16**: 206-16.
- Triboulet R, Chang HM, Lapierre RJ, Gregory RI (2009). Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor. *RNA* **15**: 1005-11.
- Tsuchiyama K, Ito H, Taga M, Naganuma S, Oshinoya Y, Nagano KI *et al* (2012). Expression of MicroRNAs associated with Gleason grading system in prostate cancer: miR-182-5p is a useful marker for high grade prostate cancer. *Prostate*.
- Turner DP, Findlay VJ, Moussa O, Semchenko VI, Watson PM, LaRue AC *et al* (2011). Mechanisms and functional consequences of PDEF protein expression loss during prostate cancer progression. *Prostate* **71**: 1723-35.
- Ueno K, Hirata H, Shahryari V, Deng G, Tanaka Y, Tabatabai ZL *et al* (2013). microRNA-183 is an oncogene targeting Dkk-3 and SMAD4 in prostate cancer. *Br J Cancer*.
- Ul Hussain M (2012). Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res* **349**: 405-13.
- Unni E, Sun S, Nan B, McPhaul MJ, Cheskis B, Mancini MA *et al* (2004). Changes in androgen receptor nongenotropic signaling correlate with transition of LNCaP cells to androgen independence. *Cancer Res* **64**: 7156-68.
- van de Wijngaart DJ, Dubbink HJ, van Royen ME, Trapman J, Jenster G (2011). Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. *Mol Cell Endocrinol* **352**: 57-69.
- van Royen ME, Cunha SM, Brink MC, Mattern KA, Nigg AL, Dubbink HJ *et al* (2007). Compartmentalization of androgen receptor protein-protein interactions in living cells. *J Cell Biol* **177**: 63-72.
- Vanacker JM, Bonnelye E, Chopin-Delannoy S, Delmarre C, Cavailles V, Laudet V (1999). Transcriptional activities of the orphan nuclear receptor ERR alpha (estrogen receptor-related receptor-alpha). *Mol Endocrinol* **13**: 764-73.
- Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H *et al* (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* **33**: 6566-78.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**: 1931-4.
- Vega FM, Fruhwirth G, Ng T, Ridley AJ (2011). RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *J Cell Biol* **193**: 655-65.
- Vega RB, Kelly DP (1997). A role for estrogen-related receptor alpha in the control of mitochondrial fatty acid beta-oxidation during brown adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **272**: 31693-9.

- Verrijdt G, Schoenmakers E, Alen P, Haelens A, Peeters B, Rombauts W *et al* (1999). Androgen specificity of a response unit upstream of the human secretory component gene is mediated by differential receptor binding to an essential androgen response element. *Mol Endocrinol* **13**: 1558-70.
- Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W *et al* (2000). Change of specificity mutations in androgen-selective enhancers. Evidence for a role of differential DNA binding by the androgen receptor. *J Biol Chem* **275**: 12298-305.
- Vicini FA, Vargas C, Abner A, Kestin L, Horwitz E, Martinez A (2005). Limitations in the use of serum prostate specific antigen levels to monitor patients after treatment for prostate cancer. *J Urol* **173**: 1456-62.
- Vickers MM, Bar J, Gorn-Hondermann I, Yarom N, Daneshmand M, Hanson JE *et al* (2012). Stage-dependent differential expression of microRNAs in colorectal cancer: potential role as markers of metastatic disease. *Clin Exp Metastasis* **29**: 123-32.
- Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinanen R, Palmberg C *et al* (1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* **9**: 401-6.
- Vishnubhotla R, Sun S, Huq J, Bulic M, Ramesh A, Guzman G *et al* (2007). ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging. *Lab Invest* **87**: 1149-58.
- Viticchie G, Lena AM, Latina A, Formosa A, Gregersen LH, Lund AH *et al* (2011). MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle* **10**: 1121-31.
- Vlachos IS, Hatzigeorgiou AG (2013). Online resources for miRNA analysis. *Clin Biochem.*
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F *et al* (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2257-61.
- Wach S, Nolte E, Szczyrba J, Stohr R, Hartmann A, Orntoft T *et al* (2012). MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening. *Int J Cancer* **130**: 611-21.
- Waltering KK, Porkka KP, Jalava SE, Urbanucci A, Kohonen PJ, Latonen LM *et al* (2011). Androgen regulation of micro-RNAs in prostate cancer. *Prostate* **71**: 604-14.
- Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD (2006). Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell* **22**: 553-60.
- Wang D, Tindall DJ (2011). Androgen action during prostate carcinogenesis. *Methods Mol Biol* **776**: 25-44.

- Wang G, Wang Y, Feng W, Wang X, Yang JY, Zhao Y *et al* (2008a). Transcription factor and microRNA regulation in androgen-dependent and -independent prostate cancer cells. *BMC Genomics* **9 Suppl 2**: S22.
- Wang L, Hsu CL, Chang C (2005). Androgen receptor corepressors: an overview. *Prostate* **63**: 117-30.
- Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR (1999). Phosphorylation/dephosphorylation of androgen receptor as a determinant of androgen agonistic or antagonistic activity. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 21-8.
- Wang Q, Li W, Liu XS, Carroll JS, Janne OA, Keeton EK *et al* (2007). A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. *Mol Cell* **27**: 380-92.
- Wang Q, Li W, Zhang Y, Yuan X, Xu K, Yu J *et al* (2009). Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. *Cell* **138**: 245-56.
- Wang Y, Sheng G, Juranek S, Tuschl T, Patel DJ (2008b). Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* **456**: 209-13.
- Wang Z, Liu L, Hou J, Wen D, Yan C, Pu J *et al* (2008c). Rapid membrane effect of testosterone in LNCaP cells. *Urol Int* **81**: 353-9.
- Wang Z, Yao H, Lin S, Zhu X, Shen Z, Lu G *et al* (2013). Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs. *Cancer Lett* **331**: 1-10.
- Watahiki A, Macfarlane RJ, Gleave ME, Crea F, Wang Y, Helgason CD *et al* (2013). Plasma miRNAs as Biomarkers to Identify Patients with Castration-Resistant Metastatic Prostate Cancer. *Int J Mol Sci* **14**: 7757-70.
- Watahiki A, Wang Y, Morris J, Dennis K, O'Dwyer HM, Gleave M *et al* (2011). MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. *PLoS One* **6**: e24950.
- Watanabe M, Yanagisawa J, Kitagawa H, Takeyama K, Ogawa S, Arao Y *et al* (2001). A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J* **20**: 1341-52.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ *et al* (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* **56**: 1733-41.
- Wehling M (1997). Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* **59**: 365-93.
- White NM, Youssef YM, Fendler A, Stephan C, Jung K, Youssef GM (2012). The miRNA-kallikrein axis of interaction: a new dimension in the pathogenesis of prostate cancer. *Biol Chem* **393**: 379-89.

- Wilson JD (1999). The role of androgens in male gender role behavior. *Endocr Rev* **20**: 726-37.
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* **11**: 228-34.
- Wissmann M, Yin N, Muller JM, Greschik H, Fodor BD, Jenuwein T *et al* (2007). Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression. *Nat Cell Biol* **9**: 347-53.
- Wong AM, Kong KL, Tsang JW, Kwong DL, Guan XY (2012). Profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma reveals potential biomarkers and oncomirs. *Cancer* **118**: 698-710.
- Wong CC, Wong CM, Tung EK, Man K, Ng IO (2009). Rho-kinase 2 is frequently overexpressed in hepatocellular carcinoma and involved in tumor invasion. *Hepatology* **49**: 1583-94.
- Wong YC, Wang YZ (2000). Growth factors and epithelial-stromal interactions in prostate cancer development. *Int Rev Cytol* **199**: 65-116.
- Wright AS, Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB, Rittmaster RS (1996). Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *J Clin Invest* **98**: 2558-63.
- Wu H, Huang M, Cao P, Wang T, Shu Y, Liu P (2012a). MiR-135a targets JAK2 and inhibits gastric cancer cell proliferation. *Cancer Biol Ther* **13**: 281-8.
- Wu H, Zhu S, Mo YY (2009). Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res* **19**: 439-48.
- Wu L, Fan J, Belasco JG (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4034-9.
- Wu S, Lin Y, Xu D, Chen J, Shu M, Zhou Y *et al* (2011). MiR-135a functions as a selective killer of malignant glioma. *Oncogene* **31**: 3866-74.
- Wu YJ, Tang Y, Li ZF, Li Z, Zhao Y, Wu ZJ *et al* (2013). Expression and significance of Rac1, Pak1 and Rock1 in gastric carcinoma. *Asia Pac J Clin Oncol*.
- Wu Z, He B, He J, Mao X (2012b). Upregulation of miR-153 promotes cell proliferation via downregulation of the PTEN tumor suppressor gene in human prostate cancer. *Prostate* **73**: 596-604.
- Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS, Sahai E (2006). ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol* **16**: 1515-23.

- Xiao J, Gong AY, Eischeid AN, Chen D, Deng C, Young CY *et al* (2012). miR-141 modulates androgen receptor transcriptional activity in human prostate cancer cells through targeting the small heterodimer partner protein. *Prostate* **72**: 1514-22.
- Xin L (2012). Cells of origin for cancer: an updated view from prostate cancer. *Oncogene*.
- Xu B, Niu X, Zhang X, Tao J, Wu D, Wang Z *et al* (2011). miR-143 decreases prostate cancer cells proliferation and migration and enhances their sensitivity to docetaxel through suppression of KRAS. *Mol Cell Biochem* **350**: 207-13.
- Xu B, Wang N, Wang X, Tong N, Shao N, Tao J *et al* (2012). MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer. *Prostate* **72**: 1171-8.
- Xu G, Wu J, Zhou L, Chen B, Sun Z, Zhao F *et al* (2010). Characterization of the small RNA transcriptomes of androgen dependent and independent prostate cancer cell line by deep sequencing. *PLoS One* **5**: e15519.
- Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS (2009). MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* **137**: 647-58.
- Xu Y, Chen SY, Ross KN, Balk SP (2006). Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Res* **66**: 7783-92.
- Yamada Y, Hidaka H, Seki N, Yoshino H, Yamasaki T, Itesako T *et al* (2012). Tumor-suppressive microRNA-135a inhibits cancer cell proliferation by targeting the c-MYC oncogene in renal cell carcinoma. *Cancer Sci* **104**: 304-12.
- Yamagata K, Fujiyama S, Ito S, Ueda T, Murata T, Naitou M *et al* (2009). Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Mol Cell* **36**: 340-7.
- Yamaguchi S, Yamahara K, Homma K, Suzuki S, Fujii S, Morizane R *et al* (2011). The role of microRNA-145 in human embryonic stem cell differentiation into vascular cells. *Atherosclerosis* **219**: 468-74.
- Yamamura S, Saini S, Majid S, Hirata H, Ueno K, Deng G *et al* (2012). MicroRNA-34a modulates c-Myc transcriptional complexes to suppress malignancy in human prostate cancer cells. *PLoS One* **7**: e29722.
- Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N *et al* (2011). Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol* **32**: 583-8.
- Yamasaki T, Yoshino H, Enokida H, Hidaka H, Chiyomaru T, Nohata N *et al* (2012). Novel molecular targets regulated by tumor suppressors microRNA-1 and microRNA-133a in bladder cancer. *Int J Oncol* **40**: 1821-30.

Yang CH, Yue J, Fan M, Pfeffer LM (2010). IFN induces miR-21 through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway as a suppressive negative feedback on IFN-induced apoptosis. *Cancer Res* **70**: 8108-16.

Yang K, Handorean AM, Iczkowski KA (2009). MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro. *Int J Clin Exp Pathol* **2**: 361-9.

Yi R, Doehle BP, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2005). Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA* **11**: 220-6.

Yoneda A, Multhaupt HA, Couchman JR (2005). The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. *J Cell Biol* **170**: 443-53.

Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C *et al* (2007). let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* **131**: 1109-23.

Yuan YR, Pei Y, Ma JB, Kuryavyi V, Zhadina M, Meister G *et al* (2005). Crystal structure of A. aeolicus argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell* **19**: 405-19.

Zaman MS, Chen Y, Deng G, Shahryari V, Suh SO, Saini S *et al* (2010). The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *Br J Cancer* **103**: 256-64.

Zaret KS, Watts J, Xu J, Wandzioch E, Smale ST, Sekiya T (2008). Pioneer factors, genetic competence, and inductive signaling: programming liver and pancreas progenitors from the endoderm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **73**: 119-26.

Zeng Y, Cullen BR (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* **32**: 4776-85.

Zhang C, Wang L, Wu D, Chen H, Chen Z, Thomas-Ahner JM *et al* (2011a). Definition of a FoxA1 Cistrome that is crucial for G1 to S-phase cell-cycle transit in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* **71**: 6738-48.

Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* **21**: 5875-85.

Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* **118**: 57-68.

Zhang HL, Yang LF, Zhu Y, Yao XD, Zhang SL, Dai B *et al* (2011b). Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *Prostate* **71**: 326-31.

Zhang Y, Xie RL, Croce CM, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ *et al* (2011c). A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 9863-8.

- Zhang Y, Xie RL, Gordon J, LeBlanc K, Stein JL, Lian JB *et al* (2012). Control of mesenchymal lineage progression by microRNAs targeting skeletal gene regulators Trps1 and Runx2. *J Biol Chem* **287**: 21926-35.
- Zhao XY, Malloy PJ, Krishnan AV, Swami S, Navone NM, Peehl DM *et al* (2000). Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat Med* **6**: 703-6.
- Zheng C, Yinghao S, Li J (2012). MiR-221 expression affects invasion potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting DVL2. *Med Oncol* **29**: 815-22.
- Zhou VW, Goren A, Bernstein BE (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet* **12**: 7-18.
- Zhou W, Li X, Liu F, Xiao Z, He M, Shen S *et al* (2012). MiR-135a promotes growth and invasion of colorectal cancer via metastasis suppressor 1 in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **44**: 838-46.
- Zhou X, Ruan J, Wang G, Zhang W (2007). Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol* **3**: e37.
- Zhou ZX, Lane MV, Kemppainen JA, French FS, Wilson EM (1995). Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol* **9**: 208-18.
- Zhu C, Li J, Ding Q, Cheng G, Zhou H, Tao L *et al* (2013). miR-152 controls migration and invasive potential by targeting TGFalpha in prostate cancer cell lines. *Prostate*.

ANNEXE : ARTICLE

Full Title Androgen-regulated microRNA-135a decreases prostate cancer cell migration and invasion by down-regulating ROCK1 and ROCK2 protein expression.

Running Title: Androgen-regulated miR-135a targets ROCK1 and ROCK2

Authors: Auriane KROISS¹, Séverine VINCENT¹, Myriam DECAUSSIN-PETRUCCI^{1,2,3}, Emmanuelle MEUGNIER⁴, Alain RUFFION^{1,2,5}, Frédéric CHALMEL⁶, Jacques SAMARUT^{1,2,7} and Nathalie ALLIOLI^{1,8}

Authors Affiliations:

¹IGFL, CNRS UMR5242, Université Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France.

²Faculté de Médecine Lyon-Sud, Université Lyon 1, France.

³Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, France.

⁴Laboratoire CarMen, INSERM U1060, INRA1362, Université Lyon 1, Faculté de Médecine Lyon-Sud, France.

⁵Service d'Urologie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, France.

⁶GERHM, INSERM U1085-Irset, Université de Rennes 1, France.

⁷UMOMT, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, France.

⁸ISPB de Lyon, Université Lyon 1, France.

Corresponding Author

Dr Nathalie ALLIOLI, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Hôpital Lyon-Sud, Faculté de Médecine, 165 Chemin du Grand Revoyet, F-69600 OULLINS, France.

Nathalie.Allioli@recherche.univ-lyon1.fr

Disclosure of Potential Conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Abstract

Androgen signaling through their androgen receptor AR is critical for prostate cancer development and progression. Identifying new downstream effectors of androgens/AR pathway will allow a better understanding of these mechanisms.

Using a global microRNA profiling, we identified miR-135a as an androgen up-regulated microRNA. After androgen stimulation, AR directly activates the transcription of *miR-135a2* gene by binding to an androgen response element in the promoter region.

Ectopic expression of miR-135a induces morphological modification leading to inhibition of migration and invasion in prostate cancer cells, by down-regulating ROCK1 and ROCK2 expression, two newly identified miR-135a target genes.

In human surgical samples from prostatectomy, miR-135a expression level in cancerous normalized to pair-matched normal counterpart tissues was inversely correlated with the pathological grading (Gleason score) and was diminished consistent with the invasion abilities of tumor cells, suggesting the significance of miR-135a-mediated prostate cancer progression.

Taken together, our findings implicate miR-135a as a novel effector in androgens/AR signaling and indicate that miR-135a may contribute to human prostate cancer progression.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is a commonly diagnosed cancer and represents one of the leading causes of death by cancer in men in developing countries (1). Androgens, which control the growth and differentiation of the normal prostate, play a pivotal role in the initiation and progression of prostate carcinogenesis (2-4). They function mainly by regulating target gene expression through the androgen receptor (AR). AR acts as a ligand regulated transcription factor, which binds androgen response elements (ARE) in its target genes (5). Localized PCa can be effectively treated either by surgical resection or radiation therapy. For locally advanced or metastatic PCa, first-line therapeutic strategy is androgen deprivation therapy associated with AR antagonists (6). Despite good initial response, the disease progresses to a more aggressive castration-resistant prostate cancer (CRPC) (7, 8), for which there is no curative treatment available. A clear current challenge in PCa is to understand molecular mechanisms controlling cancer progression and castration resistance, to distinguish aggressive to indolent PCa (9).

MicroRNAs (miRs) are a class of endogenous small (19-25 nucleotides) non-coding single-strand RNAs, acting as negative post-transcriptional regulators of protein-coding gene expression (10). MiRs interact by imperfect binding to specific-sequence located within the 3' untranslated region (3'UTR) of targeted mRNAs, directing mRNA inactivation and/or translational repression.

Altered miRs expression is well characterized in multiple human malignancies and links to cancer initiation and progression (11, 12). There is also an increasing biological evidence for an involvement of miRs in prostate tumorigenesis (13-16), acting like oncogenes (oncomiRs) or as tumor-suppressor genes and can promote metastases spreading to distant sites (metastamiRs).

Among deregulated miRs in PCa, some of these are under AR regulation (17-20). Studying AR signaling, including miR downstream effectors, is thus a promising strategy to identify biomarkers for prostatic tumor development, as well as potential targets for the development of innovative therapies. However, none to date have been used in clinical management of PCa.

In the present study, we identified an androgen up-regulated microRNA, miR-135a, and investigated its mechanisms of action in prostate cancer cells, through down-regulating

ROCK1 and ROCK2 target genes. Finally, we analyzed miR-135a expression in surgical samples and explored correlation with tumor progression.

Material and Methods

Cell culture. Human prostate (LNCaP and PC-3) and HeLa cells were cultured, as indicated by the ATCC.

Androgen treatment. LNCaP cells were deprived of steroid during 48 h in phenol red-free RPMI 1640 medium supplemented with 5% charcoal filtered fetal bovine serum (FBS) and treated with R1881 (methyltrienolone, Perkin Elmer). For anti-androgen treatment, bicalutamide (10 μ M; Astra Zeneca) was added to the medium 30 min before R1881 stimulation.

RNA extraction. Total RNA was extracted from cells and tissue samples using TriPURE Isolation Reagent (ROCHE).

Quantification of mature miR-135a by RT-qPCR. The reverse transcription (RT) reactions were performed, using TaqMan® microRNA RT Kit and TaqMan® small RNA primers assays (Applied Biosystems), with 200 or 10 ng total RNA for miR-135a or U6 snRNA, respectively. QPCR were performed with noUNG TaqMan® Universal Master PCR mix (Applied Biosystems). MiR-135a expression was normalized relative to U6 snRNA expression level. For tissue samples, RT reactions were performed with 10 ng total RNA and miR-135a expression was normalized relative to the RNU24 expression. Relative quantification was done using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula.

Quantification of pri-miR and mRNA by RT-qPCR. cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA treated with DNaseI, using the First-Strand cDNA Synthesis kit (Life Technologies). QPCR were performed using QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen) and primers listed in **supplementary Table 1**. Values were normalized by the median of housekeeping genes expression (TBP, RPS17, RPLP0; QuantiTect Primers, Qiagen). Relative quantification was done using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula.

Functional ARE identification by luciferase reporter assay. Fragments upstream of the miR-135a2 genomic location were amplified by PCR from LNCaP genomic DNA (primers listed in **supplementary Table 1**) and cloned into the pGL3-promoter vector (Promega). Two

point mutations in the ARE-2 were inserted using the QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Luciferase reporter assay was done, as previously described (21).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). ChIP assay was done in LNCaP cells as previously described (21). Primers used for qPCR are listed in **supplementary Table 1**.

miRNA, siRNA and plasmid transfections. miRNA mimics (50 nM miR-135a or miR-NC negative control#2; Applied Biosystems), pCAGmycROCK1 (a gift from MF Olson) and pmirGLO were transfected into cells using Lipofectamine2000 (Life Technologies). siRNA anti-AR, anti-ROCK1, anti-ROCK2 or si-Non Targeting (si-NT) (50 nM ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon) were transfected into cells using DharmaFECT (Dharmacon).

Protein extraction and Western Blot. 50 µg of proteins were analyzed by western blotting using anti-ROCK1 (GTX113266, 1:500, GeneTex), anti-ROCK2 (sc-1851, 1:200, Santa Cruz) and anti-β-tubulin (T4026, 1:4 000, Sigma-Aldrich) antibodies. Protein expression was quantified with MultiGauge software and normalized to β-Tubulin expression.

Luciferase reporter assay for 3'UTR/miR interaction. The 3'UTR of human ROCK1 (nt 1-920) and ROCK2 (nt 1-816) were amplified by PCR from LNCaP genomic DNA (primers listed in **supplementary Table 1**) and cloned downstream of the Firefly luciferase gene in the pmirGLO vector (Promega). The miR-135a binding sites were then deleted by PCR. 6 x 10⁴ HeLa cells seeded in 24-well plates were transfected with 200 ng of pmirGLO constructs and miRNA mimics. Two days later, cells were lysed and Firefly/Renilla luciferase activities were determined using the Dual Luciferase Assay System (Promega).

Wound Healing Assay. PC-3 cells were transfected or treated with 16 µg/ml of Y-27632 (Sigma-Aldrich). Two days later, wounds were formed by scraping across cell monolayer using a micropipette tip. Phase contrast photomicrographs were recorded at 5 min intervals until 48 h, using a time-lapse microscope (Axiovert100M, Zeiss). The speed of wound closure was measured with ImageJ software. For ROCK1 rescue, 2 µg of pCAGmycROCK1 were transfected 24 h after miRNA mimics transfection.

Cell invasion assay. PC-3 cells were transfected or treated with 16 $\mu\text{g/ml}$ of Y-27632 and cultured 48 h in serum free medium containing 1% BSA. Cells were labeled 1 h at 37°C with 10 $\mu\text{g/ml}$ DiIC₁₂(3) (BD Biosciences) and seeded for 30 h into fluoroblock insert (8 μm) with GFR-Matrigel coated-membrane or not (BD Biosciences), placed in well containing 10% FBS medium. Data were expressed as percentage of invasive relative to migrating cells. For ROCK1 rescue, 2 μg of pCAGmycROCK1 were transfected 24 h after miRNA mimics transfection.

Human tissue samples. Prostate tissue with adenocarcinoma and their normal adjacent counterpart were obtained from 56 patients who underwent radical prostatectomy. None of the patients had received preoperative chemotherapy or radiation therapy. Clinical information for patients are summarized in **supplementary Tables 2-3**.

Immunohistochemistry (IHC) on tissue samples. 3 μm -thick tissue sections were prepared from 56 paraffin embedded prostate tissue samples (**Supplementary Tables 2-3**). Immunohistochemical staining with anti-ROCK1 antibody (GTX113266, 1:80, GeneTex) was performed on the Ventana Benchmark Ultra XT automated stainer, using the ultraview DAB detection kit (Ventana).

Statistical analysis. All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 5 software. A p-value < 0.05 was considered as statistically significant. Results are presented as the means + SD of three independent experiments.

Results

Identification of miR-135a as an androgen induced microRNA.

To identify new androgen-regulated miRs in prostate cells, we compared the miRNome of prostate androgen-sensitive LNCaP cells stimulated or not with 1 nM R1881. We performed a high-throughput RT-qPCR analysis (**Supplementary Data 1**) and observed that the expression of mature miR-135a and miR-135b, the two members of the miR-135 family, were statistically up-regulated by androgens. Due to the greatest induction of its expression after androgen treatment, miR-135a was chosen for further individual analyses.

As shown in **Figure 1A**, miR-135a expression, increased after 8 h of androgen treatment (2 fold over vehicle) to reach a 10 fold increase after 24 h. Moreover, the R1881-induced miR-135a expression was reduced (-76.5%) in the presence of bicalutamide, an AR antagonist (**Figure 1B**) and also following si-AR transfection (-70%; **Figure 1C**), suggesting the involvement of AR in androgen-mediated regulation of miR-135a expression. Finally, the induction of miR-135a expression by R1881 was not affected by the presence of cycloheximide (**Supplementary Figure 1A**), suggesting that the androgen-mediated miR-135a expression was directly induced by AR, without the requirement of intermediate protein factor synthesis.

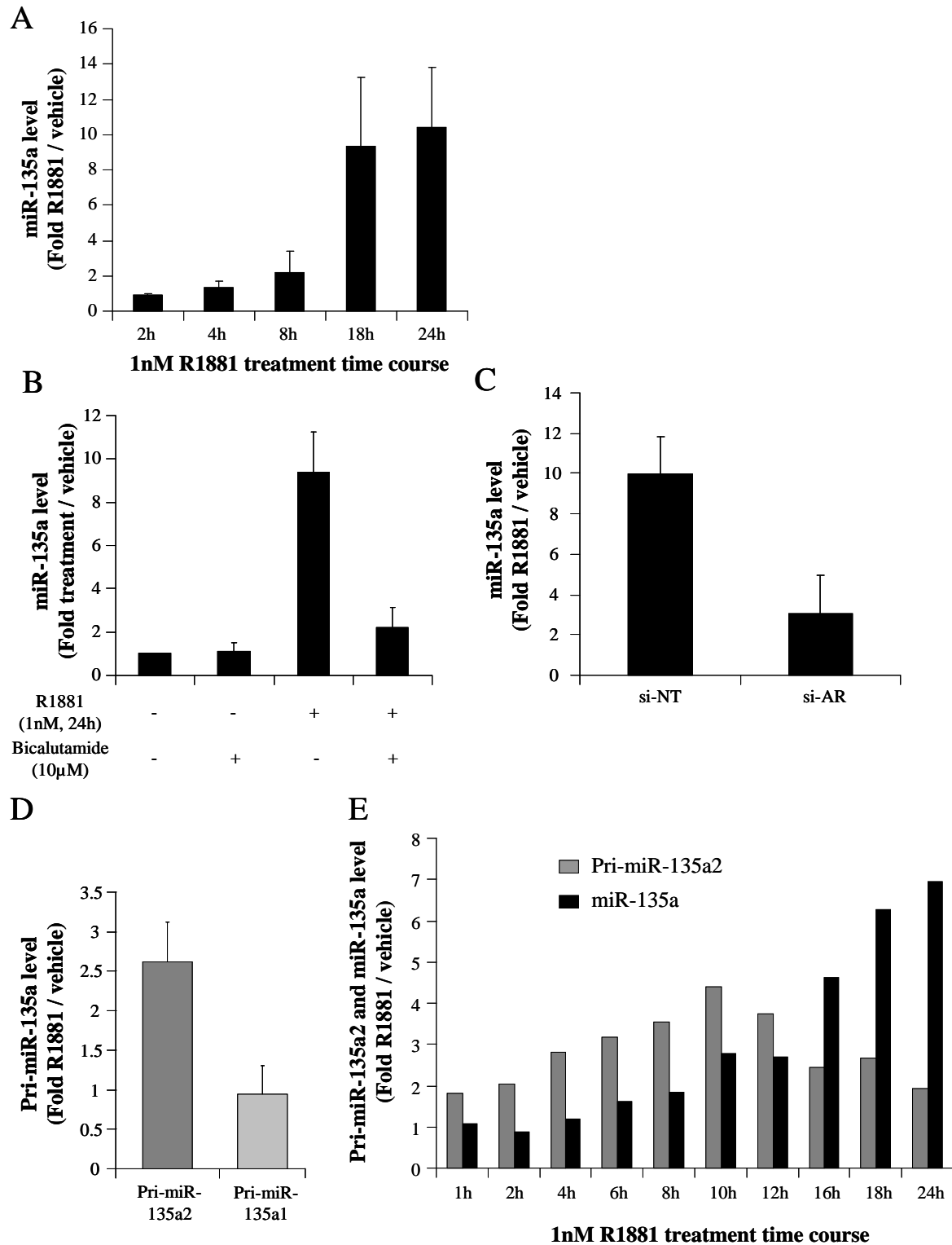


Figure 1. Androgen regulation of miR-135a expression in LNCaP cells.

In all panels, LNCaP cells were stimulated with 1 nM R1881. MiR-135a expression (mature or pri-miR) was quantified by RT-qPCR. Data are presented as fold induction in treated cells relative to untreated cells.

A. Kinetics of miR-135a expression in R1881 compared to vehicle-treated cells.

B. MiR-135a expression level in cells treated with either bicalutamide, R1881 or both relative to vehicle-treated cells.

C. MiR-135a expression level, in cells, following 48 h transfection of si-AR or si-NT and 24 h of R1881/vehicle treatment.

D. Pri-miR-135a1 and 135a2 expression in R1881/vehicle-treated cells during 24 h. **E.** Kinetics of pri-miR-135a2 and mature

miR-135a expression in R1881/vehicle-treated cells.

AR regulates miR-135a2 gene expression at transcriptional level.

The mature miR-135a could be produced by two miR-135a genes in the human genome. MiR-135a1 is localized on chromosome 3 and miR-135a2 on chromosome 12. We analysed the expression of both genes after androgenic treatment by quantifying the amount of each pri-miR (**Figure 1D**). Only pri-miR-135a2 expression was increased, suggesting a transcriptional regulation of miR-135a2 gene under androgenic stimulation.

The study of pri-miR-135a2 kinetics of expression revealed a rapid increase of its expression within 1 h after androgen treatment. The fold induction increased until 10 h and then decreased while androgenic induction of mature miR-135a expression started after 6 h and raised until 24 h (**Figure 1E**). This increase in the amount of mature miR-135a after androgen treatment results from the transcriptional enhancement of the gene and might also result from activation of the maturation process of the pri-miR. To discern between these two levels of action we blocked the transcription with actinomycin D after androgen stimulation. First, we confirmed that actinomycin D treatment induced a strong and constant decrease in pri-miR-135a2 expression starting after 6 h (**Supplementary Figure 1B**). To study the combinatory effect of R1881 and actinomycin D treatment on miR-135a expression, actinomycin D was added 6 h after androgen stimulation, such a time lag allowing transcriptional activation of pri-miR-135a2 by androgens. As expected, the level of mature miR-135a increased strongly following addition of R1881. However, this increase was blocked at 48 h in the presence of actinomycin D (**Supplementary Figure 1C**).

Taken together, these data strongly suggest that the increase in the amount of mature miR-135a following androgen stimulation results mainly from transcriptional activation of the miR-135a2 gene and that the effect on the maturation process of the pri-miR is marginal.

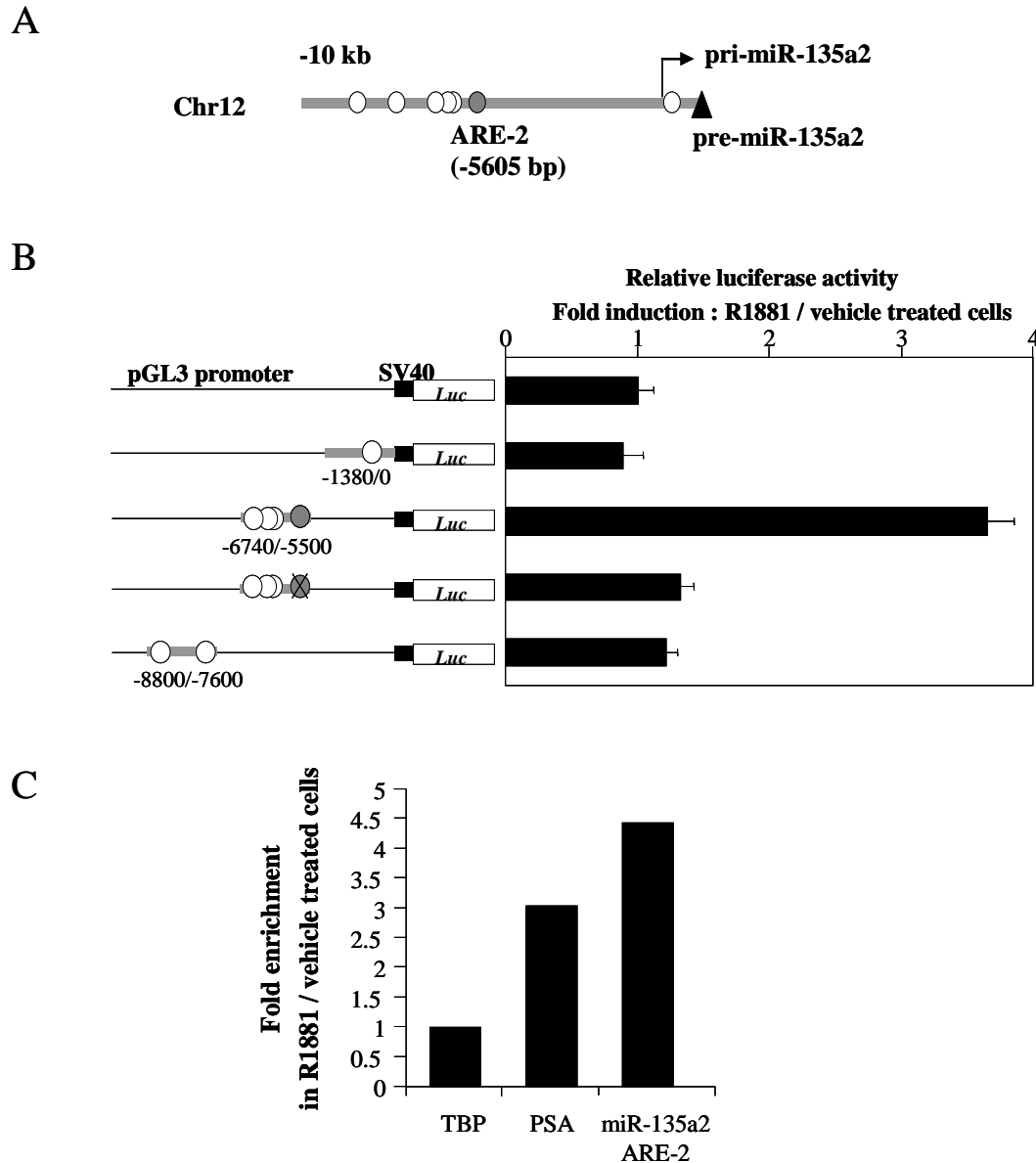


Figure 2. Characterization of transcriptional regulation elements in miR-135a2 locus.

A. Schematic locations of the *in silico*-identified AREs upstream of the pre-miR-135a2. The sequence of the ARE-2 in grey circle is the closest to the ARE consensus sequence.

B. Responsiveness to the ligand-stimulated AR of potential AREs identified upstream of the miR-135a2 locus assessed by luciferase reporter assays. HeLa cells were co-transfected with pSG5-hAR and pGL3-promoter constructs containing the potential AREs cloned upstream of the minimal promoter SV40. The ARE-2 is represented in grey. One construct contains an ARE-2 mutant represented by a grey barred circle. Cells were treated with 1 nM R1881 or vehicle for 24 h before harvesting for reporter analyses. Results are presented as the fold of luciferase activity in R1881/vehicle treated cells.

C. AR binding on ARE-2 region of *miR-135a2* in LNCaP cells treated or not 24 h with R1881 and determined by ChIP using an anti-AR antibody. The precipitated DNAs were used as templates for qPCR. As controls, promoter region of *TBP* served as non-target sequence while enhancer region of the *PSA* served as known AR target sequence.

Mechanisms of regulation of the miR-135a2 gene transcription.

MiR-135a2 sequence is localized in an intron of the non-coding RMST gene (MI0000453, <http://www.mirbase.org>). However, this gene is not expressed in LNCaP cells (unpublished data), suggesting that miR-135a2 gene has its own transcriptional regulatory sequences. By 5'RACE, we identified, in LNCaP cells, a transcription start site located 554 bp upstream of the first base of the pre-miR-135a2, which matches with the beginning of an Expressed Sequence Tag (EST, gb CA311800) (**Supplementary Figure 2**).

As miR-135a was mainly transcriptionally regulated by androgens via AR, functional androgen response elements (AREs) were searched within the miR-135a2 gene region. Using MatInspector software, we identified seven putative AREs in the 10 kb upstream of the pre-miR-135a2 (**Figure 2A**). Transcriptional activities of three ARE-containing regions (-8800/-7600; -6740/-5500; -1380/0) were tested in luciferase reporter assays. Only the construct containing the -6740/-5500 fragment induced activation (3.6 fold) of luciferase expression in response to androgens (**Figure 2B**). This construct contains four potential AREs, termed ARE-2 to ARE-5. Because the ARE-2 (caagtacagcttGTTTctc), located at -5605 bp, is very close to the ARE consensus sequence (5), the site was mutated (caagtaAagcttTTTctc) to check its role in androgen induction. As shown in **Figure 2B**, the induction of luciferase expression by R1881 was totally abolished by the mutation. Using chromatin immunoprecipitation (ChIP) with an AR specific antibody, we demonstrated in LNCaP cells a 4 fold increase of AR binding after R1881 stimulation onto the region containing ARE-2 (**Figure 2C**). Finally, these data suggest that miR-135a2 is a direct AR target gene.

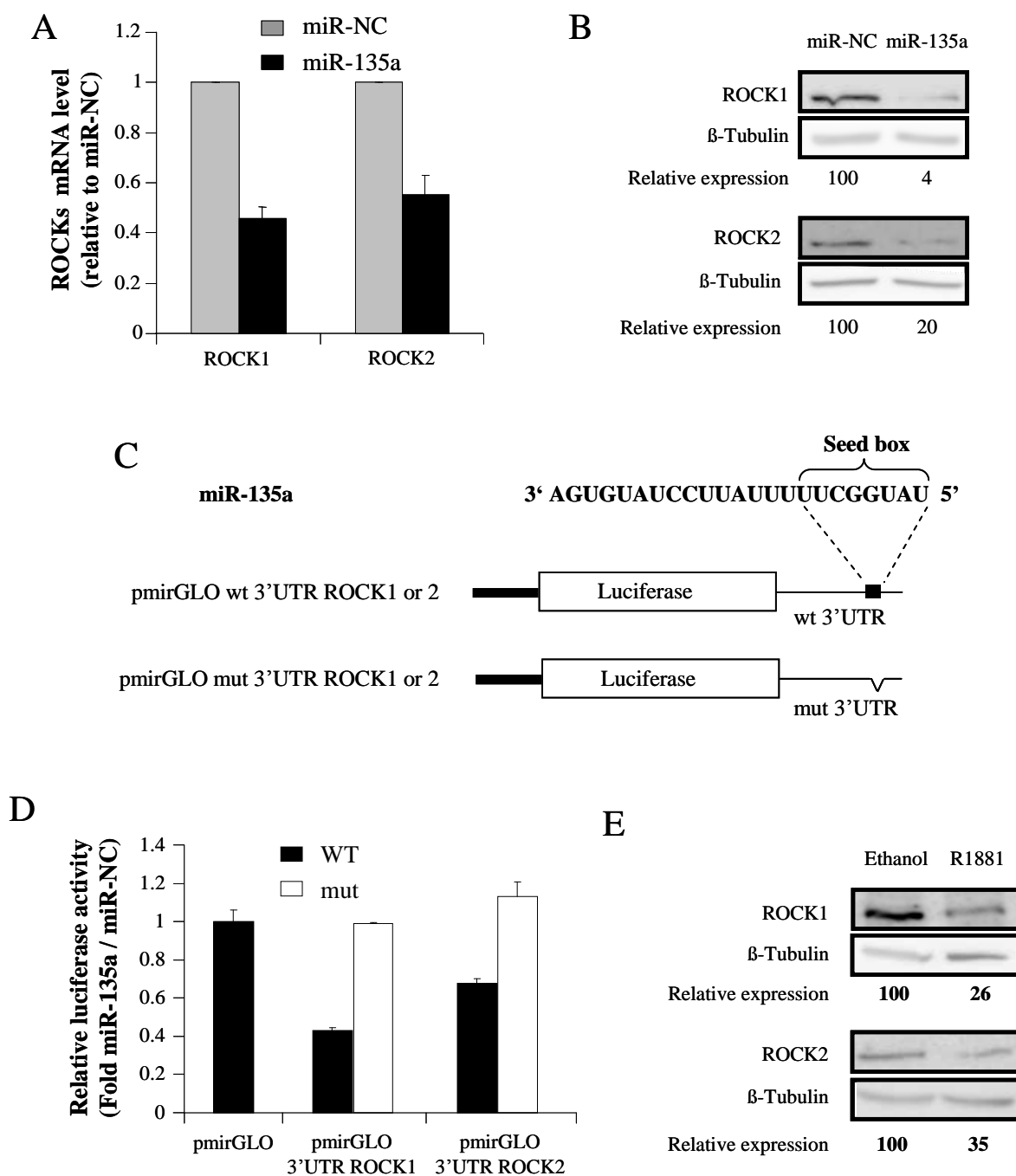


Figure 3. miR-135a down-regulates ROCK1 and ROCK2 expression through interaction with their 3'UTRs.

A. ROCK1 and ROCK2 mRNAs expression in LNCaP cells, 48 h after miRNA mimics transfection and determined by RT-qPCR. Data are fold expression in miR-135a compared to miR-NC transfected cells.

B. Western Blot analysis of ROCK1 and ROCK2 protein expression in LNCaP cells, 48 h after miRNA mimics transfection.

C. Schematic representation of plasmid constructs containing ROCK1 or ROCK2 3'UTR with the putative sites targeted by miR-135a (black square, complementary to the seed box) and the mutants deleted for miR-135a target site.

D. Interaction of miR-135a with ROCK1 and ROCK2 3'UTRs assessed by luciferase reporter assay. pmirGLO vectors containing wild type or mutant ROCK1 or ROCK2 3'UTR were transfected into HeLa cells with miR-135a or miR-NC. Results are presented as the fold of luciferase activity in miR-135a/miR-NC transfected cells.

E. Western Blot analysis of ROCK1 and ROCK2 protein expression in LNCaP cells, 48 h after R1881 treatment.

miR-135a directly targets ROCK1 and ROCK2 mRNAs.

To explore the biological role of miR-135a, we searched for its putative target mRNAs. We performed a gene expression analysis in LNCaP cells over-expressing miR-135a versus cells transfected with miR negative control (miR-NC), using pangenomic microarrays. Detailed protocol and GEO accession number are described in **Supplementary Data 2**. In LNCaP cells over-expressing miR-135a, we identified 123 deregulated genes, mainly involved in cellular movement, cellular assembly/organization and cell morphology (Gene Ontology analyses), suggesting that miR-135a over-expression might affect these biological functions. Among these deregulated genes, 67 were down-regulated, 39 of which are potential direct targets containing complementary sequences of miR-135a seed box in their 3'UTR, as predicted by TargetScan. ROCK1 belongs to these potential direct target genes, and is involved in biological processes preferentially deregulated by miR-135a over-expression. The second member of the ROCK family, ROCK2, although not being differentially expressed in microarray analysis, is implicated in same pathways and is also predicted to be a potential target gene (TargetScan). So, we focused our further analysis on ROCK1 and ROCK2, as potential targets of miR-135a.

We confirmed the effect of miR-135a over-expression on the regulation of ROCK1 and ROCK2 expression, at mRNA and protein levels, by RT-qPCR and western blot analyses, respectively. LNCaP cells transfected with miR-135a mimics showed nearly 50% decrease in ROCK1 and ROCK2 mRNA levels (**Figure 3A**) and a dramatic decrease of ROCK1 and ROCK2 protein levels (up to 96% and 80% respectively, **Figure 3B**), as compared to control cells. Next, we generated plasmids containing the 3'UTR of ROCK1 or ROCK2 downstream of a luciferase gene (wt 3'UTR) and plasmids with deletion of the sequences recognized by the miR-135a (mut 3'UTR) (**Figure 3C**). In HeLa cells co-transfected with miR-135a mimics, and wild type constructs, we observed a decrease in the luciferase activities (-57% and -32% for ROCK1 and ROCK2 constructs, respectively; **Figure 3D**), as compared to pmirGLO empty vector. In contrast, the expressions of the luciferase from mutant constructs were not affected by miR-135a over-expression. These data reveal a direct interaction between miR-135a and 3'UTR of ROCK1 and ROCK2 mRNAs. Altogether, these data confirm that ROCK1 and ROCK2 are specific direct targets of miR-135a.

In R1881-treated LNCaP cells, in which miR-135a expression was increased, we also observed a decrease in ROCK1 and ROCK2 protein amounts (-74% and -65%, respectively; **Figure 3E**), suggesting that androgens down-regulate the expression of these two proteins through miR-135a.

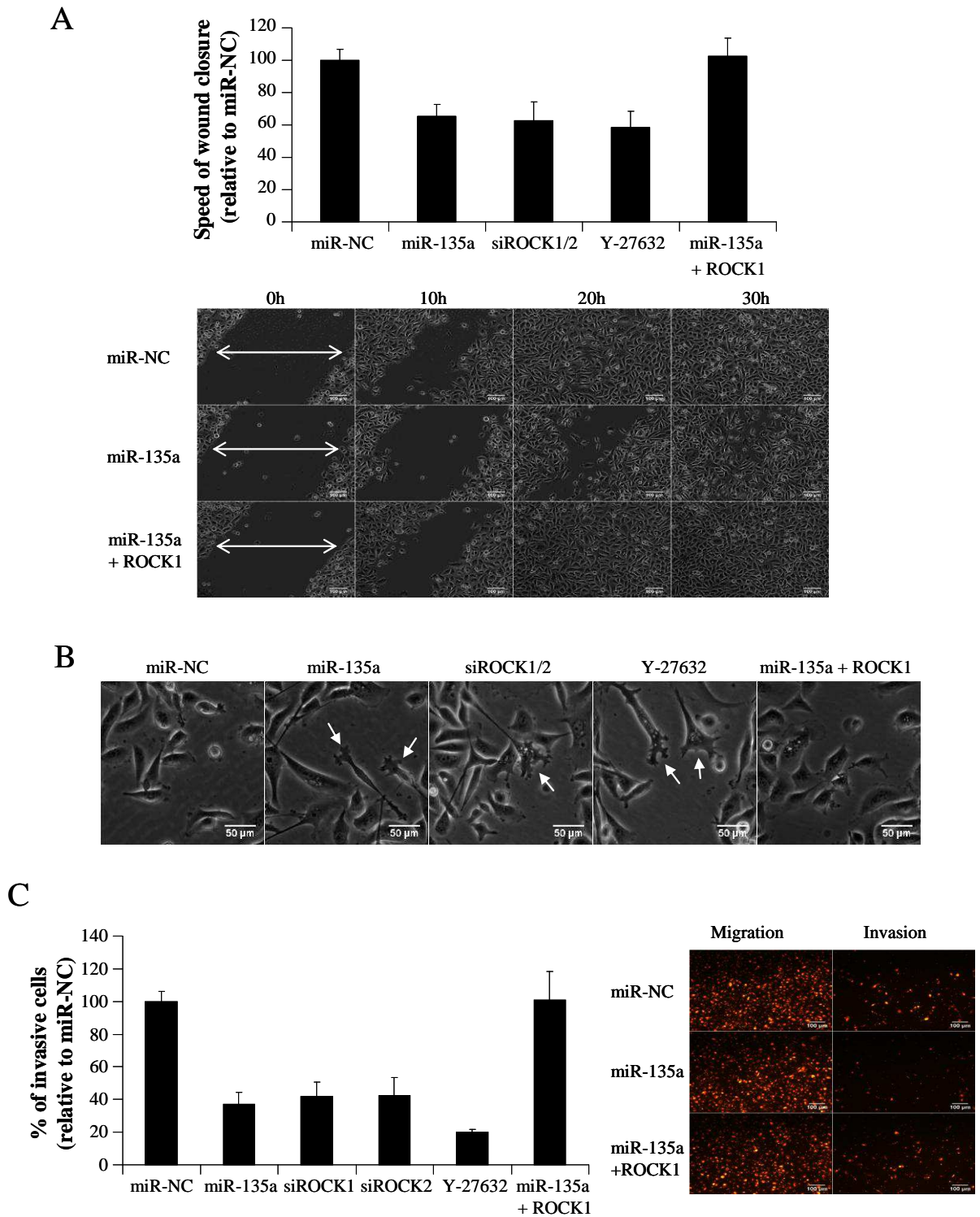


Figure 4. miR-135a decreases migration and invasion abilities via ROCK pathway.

A. Time-lapse microscopy analysis of cell migration. PC-3 cells, transfected with either miR-NC, miR-135a, siROCK1 and siROCK2 (siROCK1/2) or miR-135a and ROCK1 cDNA or treated with Y-27632 were analysed by video-microscopy in wound healing assays. The speed of wound closure was expressed as percentage relative to the one in miR-NC transfected cells. Representative pictures of wound closure are presented (Bar = 100 μm).

B. Morphology of migrated PC-3 cells in conditions described in A. Bar = 50 μm.

C. Cell invasion assay in PC-3 cells transfected with either miR-NC, miR-135a, siROCK1, siROCK2 or miR-135a and ROCK1, or treated with Y-27632. Percentage of invasive cells was determined. Representative pictures of some conditions are presented (Bar = 100 μm).

miR-135a inhibits cell migration and invasion by targeting ROCK mRNAs.

ROCK1 and ROCK2 proteins are implicated in different cellular processes like proliferation, apoptosis, migration and invasion. As both corresponding mRNAs are miR-135a targets, we wondered whether miR-135a over-expression might modulate these cellular properties. We analysed the effect of miR-135a on cell behaviour using PC-3 prostate cells, which are endowed with migratory and invasiveness properties.

In PC-3 cells over-expressing miR-135a, we did not observe any change in proliferation, cell viability and apoptosis (**Supplementary Figure 3**). But in a wound healing assay, the speed of wound closure is significantly decreased in cells transfected with miR-135a mimics (**Figure 4A**), suggesting that miR-135a has an anti-migratory action. In parallel, we artificially lowered the expression of the ROCK1 and ROCK2 proteins by co-transfecting siROCK1 and siROCK2 (siROCK1/2) or treating the cells with Y-27632, a chemical inhibitor of the ROCK kinases. These treatments also decreased cell migration, supporting the role of ROCK1 and ROCK2 in mediating the anti-migratory effect of miR-135a. To confirm this model, we co-expressed miR-135a and ROCK1 in PC-3 cells, which recovered their migratory properties. A further confirmation was brought when we looked at the phenotype of migrating cells. Cells transfected with miR-135a were elongated with multiple protrusions (**Figure 4B**), as siROCK1/2 transfected cells. Interestingly, forcing the expression of exogenous ROCK1 in cells over-expressing miR-135a restored a normal cell phenotype. All these data support then strongly the role of ROCK proteins in mediating the effects of miR-135a on cell migration.

We further analysed the role of miR-135a in cell invasiveness. As shown in **Figure 4C**, over-expression of miR-135a as well as siROCK1, siROCK2 or treatment with Y-27632 strongly decreased cell invasiveness. Here again, inhibition of cell invasiveness by miR-135a was abrogated by over-expressing ROCK1.

The effects of miR-135a, in decreasing cell migration and invasion by targeting ROCK1 and ROCK2 mRNAs, are not prostate cell specific, since similar results were obtained in HeLa cells (**Supplementary Figure 4**).

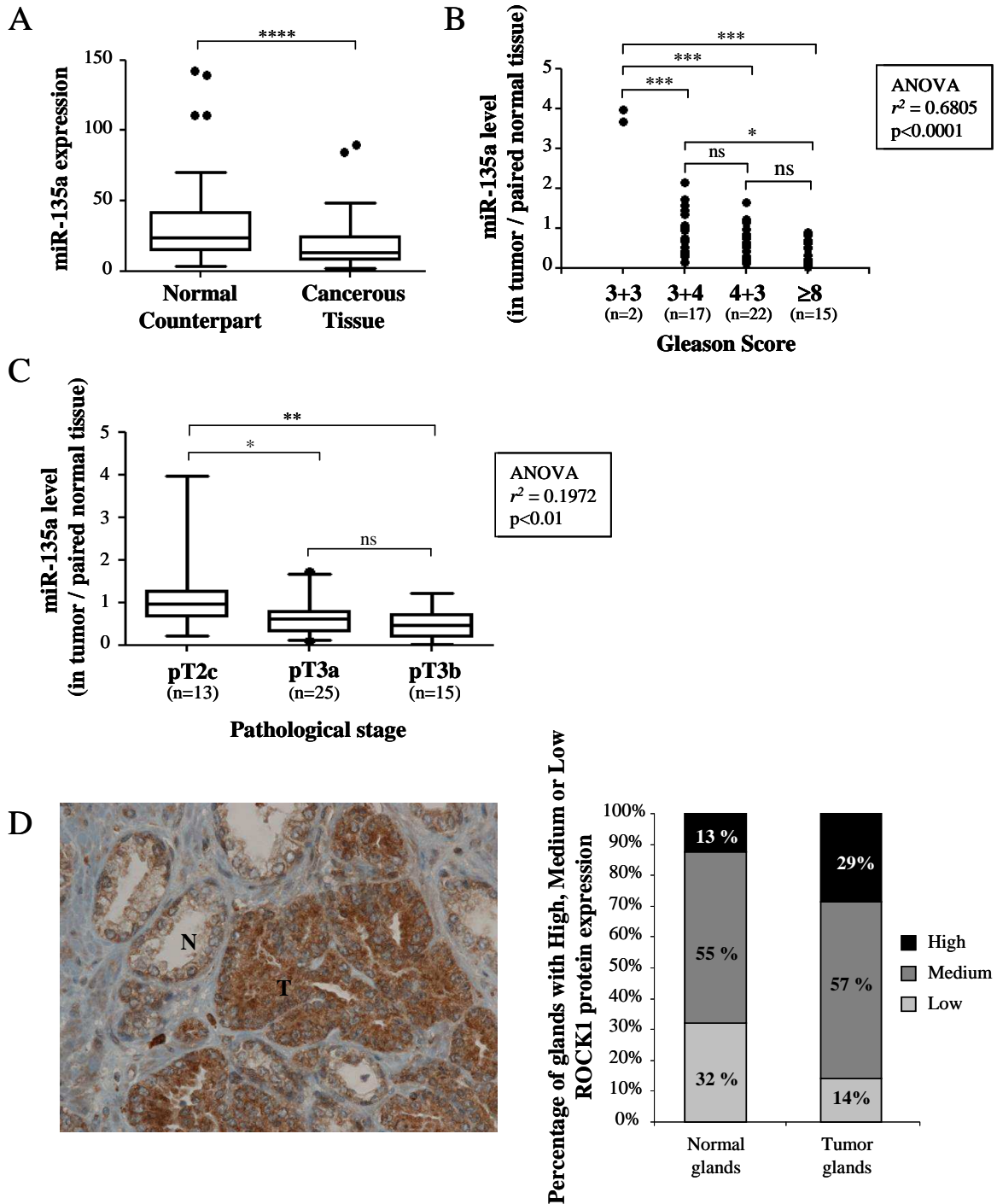


Figure 5. miR-135a expression is inversely correlated to prostate cancer progression.

MiR-135a expression in cancerous and pair-matched adjacent non-cancerous tissues from prostatectomy was determined by RT-qPCR (n=56). ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

A. MiR-135a expression in cancerous and normal counterpart tissues, analysed according to the Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test.

B. Relation between miR-135a expression in prostate samples (tumor relative to paired normal tissue from the same patient) and the Gleason score. Statistical analyses between groups were performed using an ANOVA analysis and between each group by Tukey-Kramer's Multiple Comparison test.

C. Relation between miR-135a expression in prostate samples (tumor relative to paired normal tissue from the same patient) and the pathological stage. Statistical analyses between groups were performed using an ANOVA analysis and between each group by Tukey-Kramer's Multiple Comparison test. pT2c, cancer localized within the prostatic capsule; pT3a, cancer extension outside the prostate but without seminal vesicles (SV) invasion; pT3b, cancer extension outside the prostate with SV invasion.

D. ROCK1 protein expression level in prostate samples from patients with PCa, determined by a semi-quantitative IHC analysis. Staining was evaluated as "high", "medium" and "low". A representative picture was taken at 400 x magnification. Positive signal is given by a DAB brown stain. N, normal gland ; T, tumor gland.

miR-135a expression decreases in cancerous compared to normal tissues and with prostate cancer progression.

To investigate the clinical value of miR-135a in PCa, we determined miR-135a expression level in 56 cancerous and pair-matched adjacent non-cancerous tissues from prostatectomy, by RT-qPCR (**Supplementary Tables 2-3**).

First, we found that miR-135a expression in tumor tissues was significantly lower ($p < 0.0001$) than that in paired normal tissues (**Figure 5A**).

As miR-135a is involved in migration and invasion processes in vitro, we wondered whether its expression might be correlated with PCa progression. So, we analyzed the relation between miR-135a expression and pathological grading. We observed that miR-135a expression, based on a level ratio (tumor relative to paired normal tissues for each patient), was inversely correlated with the Gleason score of PCa (**Figure 5B**). Particularly, miR-135a expression is statistically different between low (3+3 and 3+4) and high (≥ 8) scores. Interestingly, miR-135a expression was quite high in tumors with Gleason score of 6 (3+3) relative to paired normal tissue. As the Gleason score increased, a decrease of the percentage of patients for which miR-135a expression level was higher in cancerous than in normal tissue was observed. Moreover, all tumors with Gleason score ≥ 8 showed a lower expression of miR-135a relative to paired normal tissues (**Supplementary Figure 5A**).

We also observed a significant decrease in miR-135a expression between intraprostatic localized tumors (pT2c stage) and invasive extraprostatic tumors (pT3a and b stages), even if we could not separate seminal vesicle dissemination (pT3b stage) from non-seminal dissemination (pT3a stage) in extraprostatic group (**Figure 5C**). Therefore, the miR-135a expression level was also inversely correlated with pathological staging, precisely between localized and invasive tumors types.

However, there was no relation between miR-135a expression level and regional lymph node invasion, age of patient or pre-operate PSA level (**Supplementary Figures 5B-D**).

In conclusion, we observed that miR-135a expression level was inversely correlated with the Gleason score as well as with the invasion abilities of tumor cells, suggesting that decrease of miR-135a expression could reflect PCa progression.

ROCK1 protein expression is higher in tumor compared to normal prostate glands.

Immunohistochemistry analysis was performed on prostate sections with normal and tumor glands from 56 patients, in order to check whether the ROCK1 expression reflect miR-135a expression in prostate tumors. ROCK1 protein is expressed in both basal and glandular

cells of glandular epithelium. A semi-quantitative analysis revealed that the percentage of “high level” staining is higher in glandular cells of tumor glands (29 %) relative to normal glands (13 %) (**Figure 5D**). This suggests that ROCK1 expression is higher in tumor prostate tissue in which miR-135a expression is decreased.

Discussion

In the present study, we identified miR-135a as an androgen up-regulated microRNA. Several miRs demonstrate androgen-mediated expression in PCa cells (17, 18, 22-24). But except for few of them (miR-21(17); miR-27a (19); miR-32 and miR-148 (18)), the mechanisms of such androgenic regulation remain largely unexplored. MiR-135a expression can results from miR-135a1 or miR-135a2 gene expression and we demonstrated that the level of one of these two transcripts, pri-miR-135a2, increased with androgen stimulation. A functional ARE has been identified upstream of the miR-135a2 gene and AR binds to this region within the chromatin, indicating that miR-135a2 is a new AR direct target gene in PCa cells. In contrary to miR-27a, for which androgens regulate its expression both transcriptionally (via AR binding to the promoter) and post-transcriptionally (by accelerating pri-miR processing to the mature form (19)), androgen-mediated miR-135a expression seems to result mainly from transcriptional activation of the miR-135a2 gene.

The expression of this androgen-regulated miR-135a was preferentially observed in male genital tract (data not shown), but we did not observed a shift expression profile toward tissue- or cell type-specific, by transcriptomic analysis in HeLa cells over-expressing miR-135a (**Supplementary Data 2**). To explore the biological effects of miR-135a in prostate cells, we over-expressed miR-135a in LNCaP cells and performed a transcriptomic and/or in silico analyses. We identified two potential target genes ROCK1 and ROCK2, implicated in cell movement/morphology and organization processes and demonstrated that miR-135a down-regulates ROCK1 and ROCK2 expression and interacts with their 3'UTR, attesting that ROCK1 and ROCK2 are miR-135a direct targets. The involvement of Rho-associated kinases (ROCK) in malignant transformation is well documented. Depletion of ROCK inhibits invasion and metastasis (25-27) while overexpression induces such processes (25, 28, 29). Activated by Rho-GTP, ROCK1 and ROCK2 are implicated in actin cytoskeleton organization and actomyosin interaction allowing them to control cell motility, adhesion and contraction (30, 31). ROCK1 and ROCK2 depletion led to cell elongation and multiple delocalized protrusions formation (our present data, (32)). In prostate cells, there are conflicting data (32) but RhoA seems to be a critical endogenous promoter of invasion and migration (33, 34) and an inhibition of ROCK1 diminishes cell motility (35). Moreover, ROCK1 was reported to be highly involved in the transformation of PCa into CRPC and metastasis formation (36, 37).

We have shown that overexpressing miR-135a in PCa cells decreased migration and invasion abilities, as ROCKs inhibition, and over-expressing ROCK1 in these cells counteracted this effect. So miR-135a decreases prostate cancer cell migration and invasion through ROCK1 and ROCK2 down-regulation. In different cell types, miR-135a has been reported to promote cell migration/invasion or to affect proliferation/apoptosis processes, that we did not observed in prostate PC-3 cells. For example, miR-135a increases breast cancer cell migration and invasion by targeting HOXA10 (38), increases colorectal cancer cell proliferation, motility and invasion by targeting MTSS1 (39) and reduces gastric cancer cell proliferation through JAK2 down-regulation (40).

Through inducing miR-135a expression and ROCK1/ROCK2 down-regulation, androgens could reduce cell migration and invasion. However, AR could also increase these processes by regulating other migration-inducing proteins (21, 41), suggesting that the regulation of these processes is a complex balance between level of proteins activating or repressing cell migration.

We finally investigated the clinical significance of miR-135a expression in PCa samples. MiR-135a expression level is significantly reduced in tumor compared to pair-matched normal tissues and decreased during PCa progression. According to the involvement of miR-135a in ROCK pathways, such a gradually decreased miR-135a expression level from low to high grade PCa might be associated with the increase of tumor cell migration, invasion and metastasis dissemination. Indeed, as previously described by Bu et al. (42), we showed that ROCK1 protein expression is higher in tumor relative to normal glands. In parallel, by *in situ* hybridization on human normal prostate sections, we observed that expression of miR-135a is restricted to cytoplasm of epithelial cells of prostate glands (**Supplementary Figure 6**).

Aberrant patterns of miR-135a expression have been observed in multiple cancers (up-regulation in breast cancer (38), hepatocellular carcinoma (43) and colorectal cancer (39, 44, 45) and down-regulation in glioma (46), lymphoma (47), gastric cancer (40) and renal carcinoma (48)), suggesting a dual role of oncomiR or tumor suppressor for miR-135a according to the tumor.

In conclusion, we identified a novel pathway mediating effects of androgens in prostate cells, through the regulation of the microRNA-135a expression and its targets, the ROCK1/2 proteins. Studying miR-135a and the whole panel of its target genes might open a new field to identify novel potential biomarkers and alternative therapeutic strategies for survival improvement of patients with PCa.

Aknowledgements

We thank Julien DUGAS (CarMen Laboratory) for his help in statistical analyses, Christophe CHAMOT and Claire LIONNET (Microscopy Technologic Platform) from UMS3444/US8 BioSciences Gerland-Lyon Sud, Céline MICHAUX, Karine CASTELLANO and Béatrice BANCEL (Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Lyon-Sud) for patients samples preparation and IHC analysis.

Grant support: Institut Mérieux and La Ligue Contre le Cancer.

References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29.
2. Cunha GR, Riche W, Thomson A, et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 92: 221-36.
3. Matsumoto T, Sakari M, Okada M, et al. The androgen receptor in health and disease. *Annu Rev Physiol* 2013; 75: 201-24.
4. Green SM, Mostaghel EA, Nelson PS. Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 360: 3-13.
5. Denayer S, Helsen C, Thorrez L, Haelens A, Claessens F. The rules of DNA recognition by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 898-913.
6. Chen Y, Clegg NJ, Scher HI. Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. *Lancet Oncol* 2009; 10: 981-91.
7. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 34-45.
8. Knudsen KE, Penning TM. Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 315-24.
9. Takayama KI, Inoue S. Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression. *Int J Urol*.
10. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-33.
11. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5848-56.
12. Fiorucci G, Chiantore MV, Mangino G, Percario ZA, Affabris E, Romeo G. Cancer regulator microRNA: potential relevance in diagnosis, prognosis and treatment of cancer. *Curr Med Chem* 2012; 19: 461-74.
13. Fang YX, Gao WQ. Roles of microRNAs during prostatic tumorigenesis and tumor progression. *Oncogene* 2013.
14. Watahiki A, Wang Y, Morris J, et al. MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. *PLoS One* 2011; 6: e24950.
15. Hassan O, Ahmad A, Sethi S, Sarkar FH. Recent updates on the role of microRNAs in prostate cancer. *J Hematol Oncol* 2012; 5: 9.
16. Fendler A, Stephan C, Yousef GM, Jung K. MicroRNAs as regulators of signal transduction in urological tumors. *Clin Chem*; 57: 954-68.
17. Ribas J, Ni X, Haffner M, et al. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res* 2009; 69: 7165-9.
18. Jalava SE, Urbanucci A, Latonen L, et al. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene* 2012; 31: 4460-71.
19. Fletcher CE, Dart DA, Sita-Lumsden A, Cheng H, Rennie PS, Bevan CL. Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3112-27.
20. Sun D, Layer R, Mueller AC, et al. Regulation of several androgen-induced genes through the repression of the miR-99a/let-7c/miR-125b-2 miRNA cluster in prostate cancer cells. *Oncogene* 2013.

21. Alloli N, Vincent S, Vlaeminck-Guillem V, et al. TM4SF1, a novel primary androgen receptor target gene over-expressed in human prostate cancer and involved in cell migration. *Prostate* 2011.
22. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 6162-70.
23. Waltering KK, Porkka KP, Jalava SE, et al. Androgen regulation of micro-RNAs in prostate cancer. *Prostate* 2011; 71: 604-14.
24. Murata T, Takayama K, Katayama S, et al. miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010; 13: 356-61.
25. Liu S, Goldstein RH, Scepansky EM, Rosenblatt M. Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone. *Cancer Res* 2009; 69: 8742-51.
26. Imamura F, Mukai M, Ayaki M, Akedo H. Y-27632, an inhibitor of rho-associated protein kinase, suppresses tumor cell invasion via regulation of focal adhesion and focal adhesion kinase. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 811-6.
27. Yoshioka K, Foletta V, Bernard O, Itoh K. A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7247-52.
28. Lane J, Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer. *Int J Oncol* 2008; 33: 585-93.
29. Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* 1999; 5: 221-5.
30. Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010; 67: 545-54.
31. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 446-56.
32. Vega FM, Fruhwirth G, Ng T, Ridley AJ. RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *J Cell Biol* 2011; 193: 655-65.
33. Hodge JC, Bub J, Kaul S, Kajdacsy-Balla A, Lindholm PF. Requirement of RhoA activity for increased nuclear factor kappaB activity and PC-3 human prostate cancer cell invasion. *Cancer Res* 2003; 63: 1359-64.
34. Hwang YS, Hodge JC, Sivapurapu N, Lindholm PF. Lysophosphatidic acid stimulates PC-3 prostate cancer cell Matrigel invasion through activation of RhoA and NF-kappaB activity. *Mol Carcinog* 2006; 45: 518-29.
35. Somlyo AV, Bradshaw D, Ramos S, Murphy C, Myers CE, Somlyo AP. Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 652-9.
36. Lin SL, Chang D, Ying SY. Hyaluronan stimulates transformation of androgen-independent prostate cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28: 310-20.
37. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA* 2008; 14: 417-24.
38. Chen Y, Zhang J, Wang H, et al. miRNA-135a promotes breast cancer cell migration and invasion by targeting HOXA10. *BMC Cancer* 2012; 12: 111.
39. Zhou W, Li X, Liu F, et al. MiR-135a promotes growth and invasion of colorectal cancer via metastasis suppressor 1 in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2012; 44: 838-46.
40. Wu H, Huang M, Cao P, Wang T, Shu Y, Liu P. MiR-135a targets JAK2 and inhibits gastric cancer cell proliferation. *Cancer Biol Ther* 2012; 13: 281-8.
41. Obinata D, Takayama K, Urano T, et al. ARFGAP3, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Int J Cancer* 2012; 130: 2240-8.

42. Bu Q, Tang HM, Tan J, Hu X, Wang DW. [Expression of RhoC and ROCK-1 and their effects on MAPK and Akt proteins in prostate carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2011; 33: 202-6.
43. Liu S, Guo W, Shi J, et al. MicroRNA-135a contributes to the development of portal vein tumor thrombus by promoting metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2011; 56: 389-96.
44. Nagel R, le Sage C, Diosdado B, et al. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 5795-802.
45. Vickers MM, Bar J, Gorn-Hondermann I, et al. Stage-dependent differential expression of microRNAs in colorectal cancer: potential role as markers of metastatic disease. *Clin Exp Metastasis* 2012; 29: 123-32.
46. Wu S, Lin Y, Xu D, et al. MiR-135a functions as a selective killer of malignant glioma. *Oncogene* 2011; 31: 3866-74.
47. Navarro A, Diaz T, Martinez A, et al. Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2009; 114: 2945-51.
48. Hidaka H, Seki N, Yoshino H, et al. Tumor suppressive microRNA-1285 regulates novel molecular targets: aberrant expression and functional significance in renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2012; 3: 44-57.
49. Chalmel F, Primig M. The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 86.
50. Bouhallier F, Allioli N, Laval F, et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *RNA* 2010; 16: 720-31.

SUPPLEMENTARY DATA FOR KROISS ET AL.

Supplementary Data 1-2

Supplementary Figures 1-6

Supplementary Tables 1-3

Supplementary Data 1. Global microRNA expression analysis in androgen-stimulated LNCaP cells. A reverse transcription was performed using TaqMan® microRNA Reverse Transcription Kit and Megaplex RT Primers Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems), with 500 ng total RNA. A high-throughput qPCR of 377 microRNAs and 3 endogenous controls was performed with TaqMan® Array Human MicroRNA A Cards v2.0 (Applied Biosystems), according to manufacturer's instructions, on an AB7900HT system (Applied Biosystems). Ct values were determined using RQManager v1.2 software (Applied Biosystems). Values were corrected by normalization to the median of endogenous controls expression (RNU6B, RNU44 and RNU48). Fold induction of microRNA expression after R1881 stimulation was determined, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ equation. Selection of deregulated microRNAs was based on statistical analyses performed using the RealTimeStatMiner® software (Integromics). The putative androgen-regulated microRNAs were then validated by RT-qPCR in independent samples, using individual microRNA quantification assays.

Supplementary Data 2. Screening of miR-135a regulated genes using microarray technology.

- Probe labelling and array hybridization. RNA profiling in LNCaP and HeLa cells were performed using a Human Whole Genome GE 4x44k V1 oligonucleotides microarray kit (Agilent). An antisense RNA (aRNA) amplification procedure was performed (*AminoAllyl MessageAmp II aRNA amplification kit*, Ambion), using 2 µg total RNA isolated from cells transfected with miR-135a or miR-NC. The aRNA was chemical coupling to the Cy-monoreactive dye ester (Amersham). One µg of combined Cy3/Cy5 dye-labeled aRNA were hybridized competitively (miR-135a versus miR-NC transfected cells). Each experiment was repeated with a switch in fluorescent Cy3/Cy5 labels to follow a dye-swap design and account for dye effects. Four data points per hybridization spot were produced, using samples from 24 and 48 h post-transfection experiments.

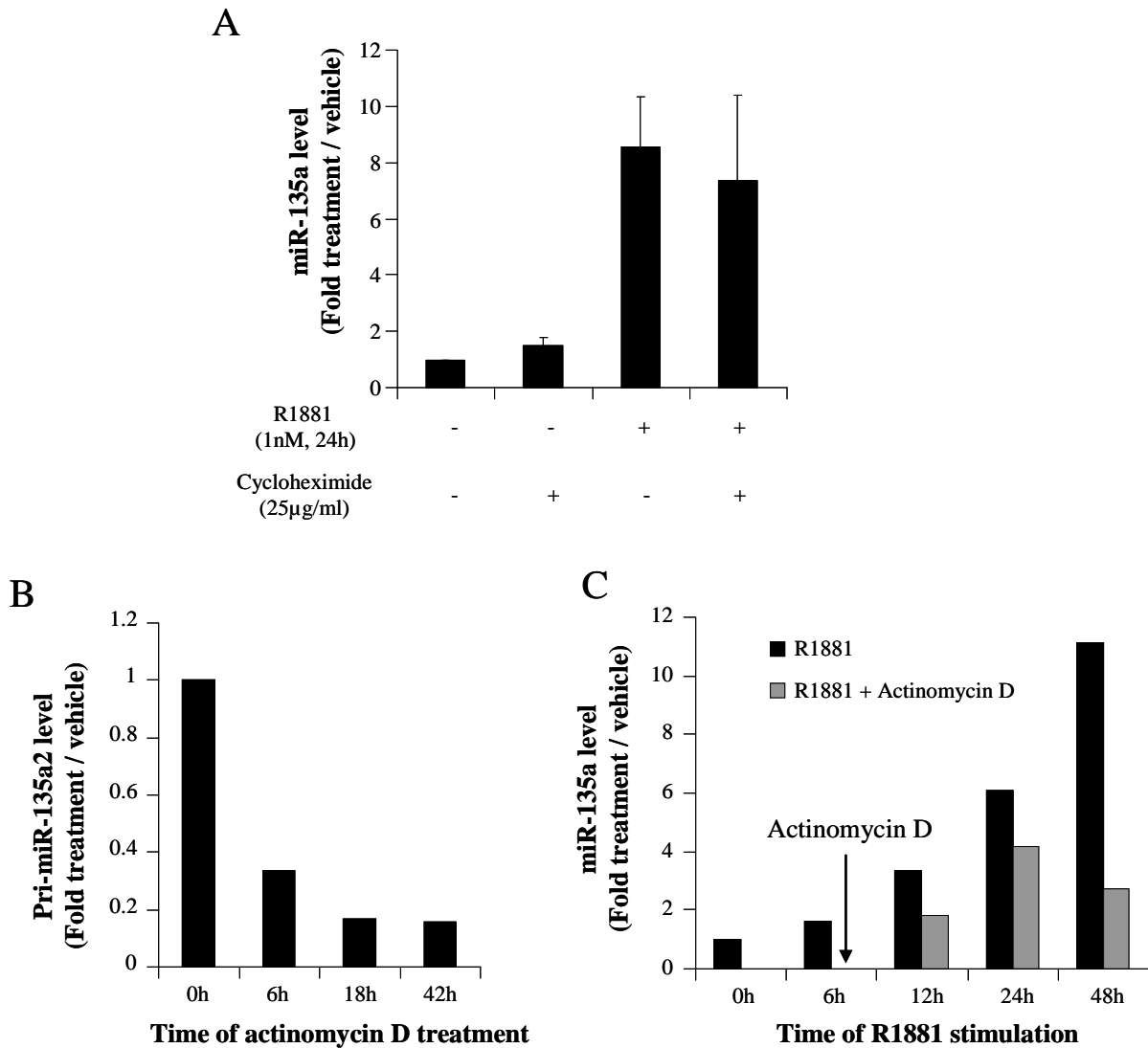
- Computational analysis of microarray data. “LNCaP” microarrays were scanned on an Agilent DNA Microarray Scanner, using two color scan setting (for both Cy3 and Cy5 channels) for 4x44k array slides. Probes quantification was performed using Feature Extraction Software 10.5 (Agilent) and data files (txt format) were generated. “HeLa” microarrays were scanned for both Cy3 and Cy5 channels with an Axon 4000B Scanner. Probes quantification was performed using GenePix Pro 6.0 software and data files (gpr format) were generated.

Background subtraction (half with an offset of 100 for “LNCaP” dataset and Normexp with an offset of 50 for “HeLa” dataset) and loess normalisation were performed using limma package (Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004;3:Article3) in R environment. Quantile normalization was added for between array normalization. Controls and low intensity/flagged probes in both channels were filtered out. Only probes present in the four experiments were analyzed (21,257 and 30,629 probes for “LNCaP” and “HeLa” dataset, respectively) and used for performing statistical analysis.

- Data deposition. The datasets are posted at NCBI’s Gene Expression Omnibus and are available through the GEO Series accession number GSE45903, with the following link:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE45903>

- Shift expression profile analysis. AMEN suite of tools was used (49), as previously described (50).



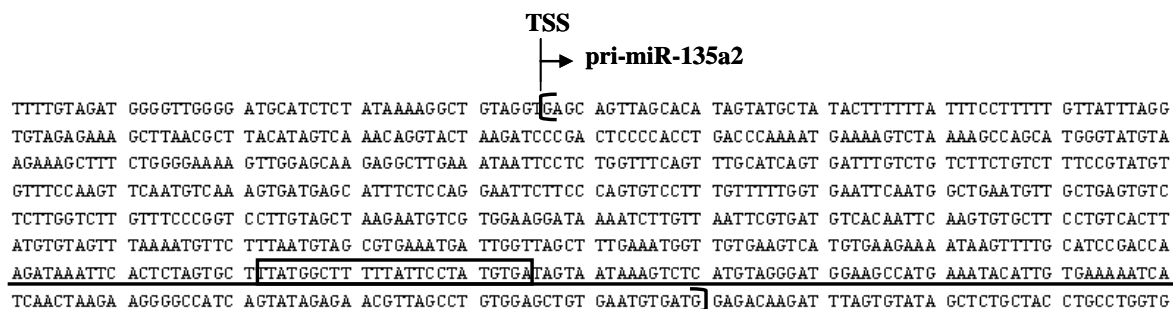
Supplementary Figure 1. Supplementary data on androgen regulation of miR-135a in LNCaP cells.

MiR-135a or pri-miR-135a2 expression was quantified by RT-qPCR. Data are presented as fold expression in LNCaP treated cells relative to control cells.

A. MiR-135a expression in LNCaP cells treated with either 25 µg/ml cycloheximide (Sigma-Aldrich), R1881 or both relative to vehicle-treated LNCaP cells. Cycloheximide was added to the medium at the same time as R1881.

B. Pri-miR-135a2 expression in actinomycin D (1 µM, Sigma-Aldrich) treated LNCaP cells relative to vehicle-treated cells.

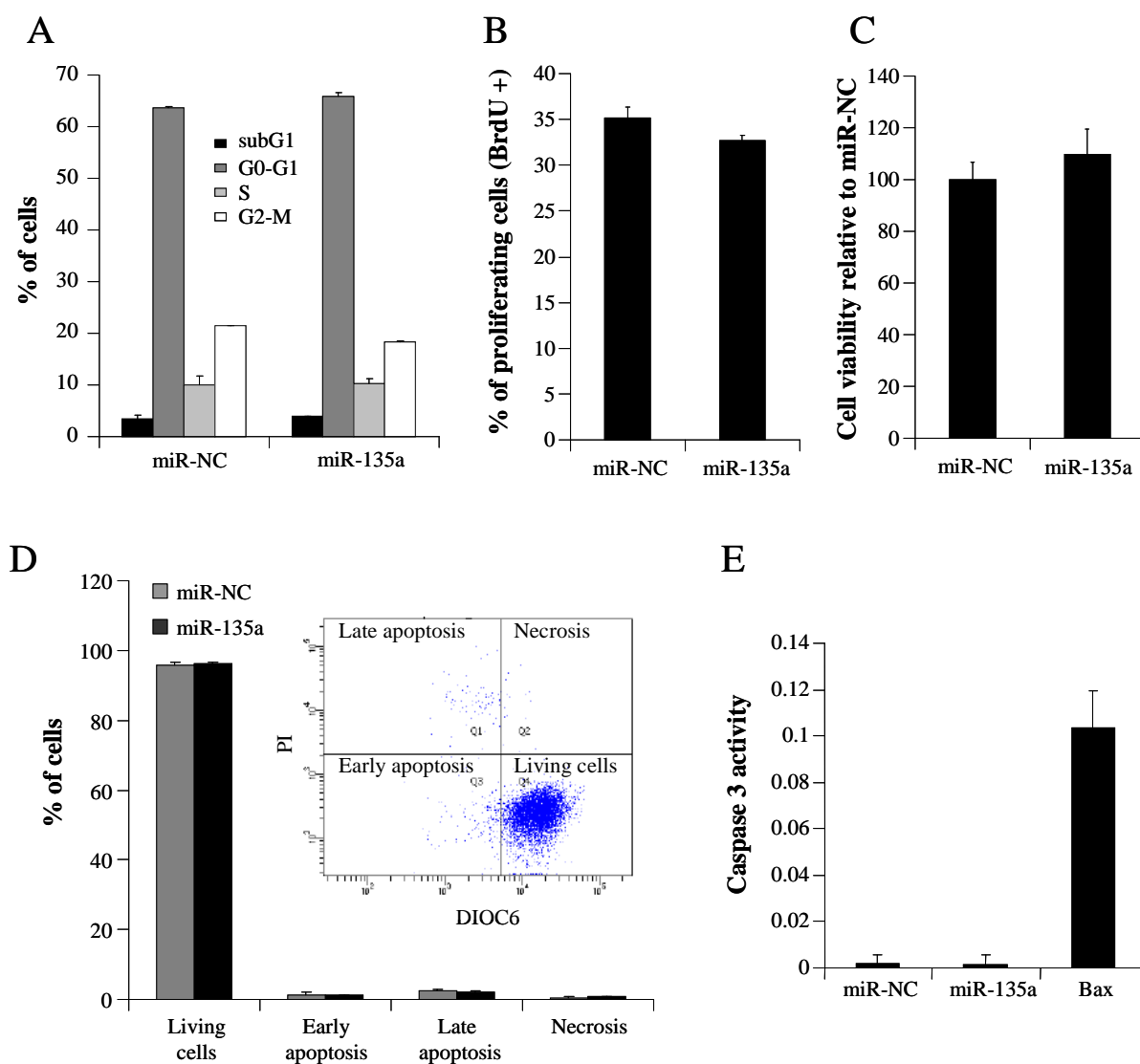
C. MiR-135a expression in R1881 or R1881+Actinomycin D treated LNCaP cells relative to vehicle-treated cells. Actinomycin D (1 µM) was added 6h after R1881 stimulation.



Supplementary Figure 2. Schematic illustration of *miR-135a2* genomic region.

The transcription start site (TSS), corresponding to the start of the pri-miR-135a2, was identified by 5'RACE and represented by an arrow. The sequence of an Expressed Sequence Tag (EST), starting at same location as TSS, was found in BLAST analysis and represented flanked by two brackets. The sequences of the pre-miR-135a2 (underlined) and of the miR mature (surrounded) were recovered from miRBase with accession number MI0000453.

5'RACE was done using RNA (1 µg) extracted from LNCaP cells with RNeasy mini kit (Qiagen) and the 5'RACE system for rapid amplification of cDNA ends (Life Technologies) with GSP1 for RT 5'-TCCATCCCTACATGAGACTTTT-3'; GSP2 for first PCR: 5'-ATCTTGGTTCGGATGCAAAAC-3'; and GSP3 for nested PCR: 5'-CTTCACATGACTTCACAACC-3'. Finally, The PCR product was cloned by TA cloning in pGEM-Teasy vector (Promega) and sequenced.



Supplementary Figure 3. Effect of miR-135a over-expression on proliferation, cell viability and apoptosis of PC-3 cells. PC-3 cells were transfected with miR-135a or negative control (miR-NC) for 24 h.

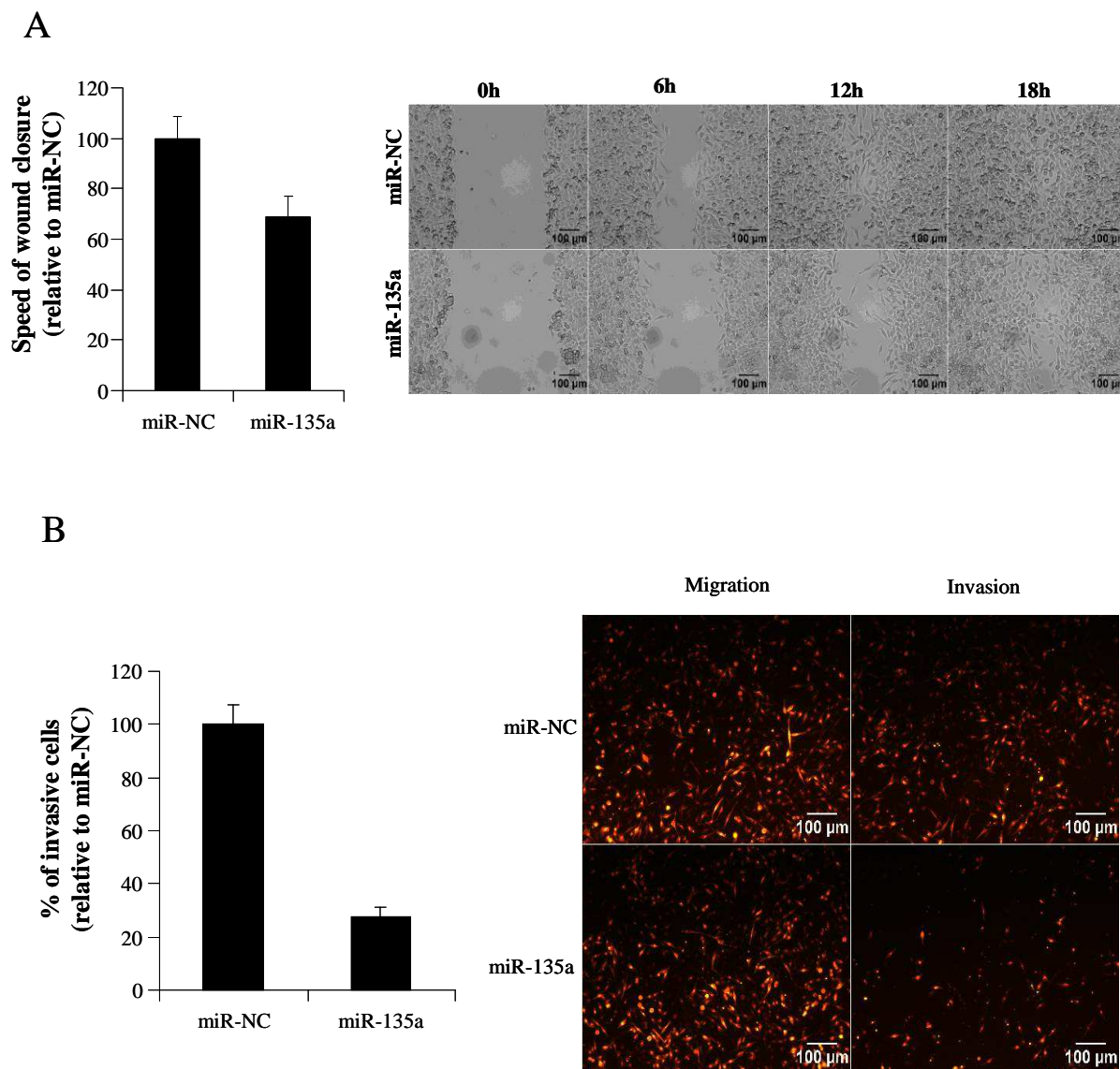
A. Percentage of cells in different phases of the cell cycle. Cells were fixed with 70% ethanol for 60 min at -20°C and stained with 40 µg/ml Propidium Iodide (PI, Sigma), 200 µg/ml RNaseA (Roche) in PBS. 104 events were analyzed using a BD LSRII Flow cytometer.

B. Percentage of proliferating cells measured by BrdU incorporation (BD Biosciences) and flow cytometry analyses.

C. Cell viability measured by ATP quantification in metabolically active cells, with the Vialight Plus cell Proliferation and Cytotoxicity Bioassay Kit (Lonza).

D. Cell apoptosis measured with DIOC6 (3,3,9-dioxyloxacarbocyanine, Molecular Probes) -PI double staining and flow cytometry analyses, 8h-24h after transfection. Cells were incubated 15 min at 37°C with 40 nM DIOC6 to evaluate mitochondrial activity. PI (0.5 µg/ml) was added and incorporated into DNA of dead cells, whose membrane is permeabilised. Living cells are DIOC6+PI- whereas apoptotic cells are DIOC6+PI+.

E. Caspase 3 activity measured with caspase-3/CPP32 fluorometric assay kit (Biovision). Activated caspase 3 present in protein lysates can cleave the substrate DEVD-AFC. Free AFC was quantified using a fluorometer and activity of caspase 3 was determined by the slope of fluorescence/time kinetics. A transfection with Bax expression vector was used as positive apoptosis control.

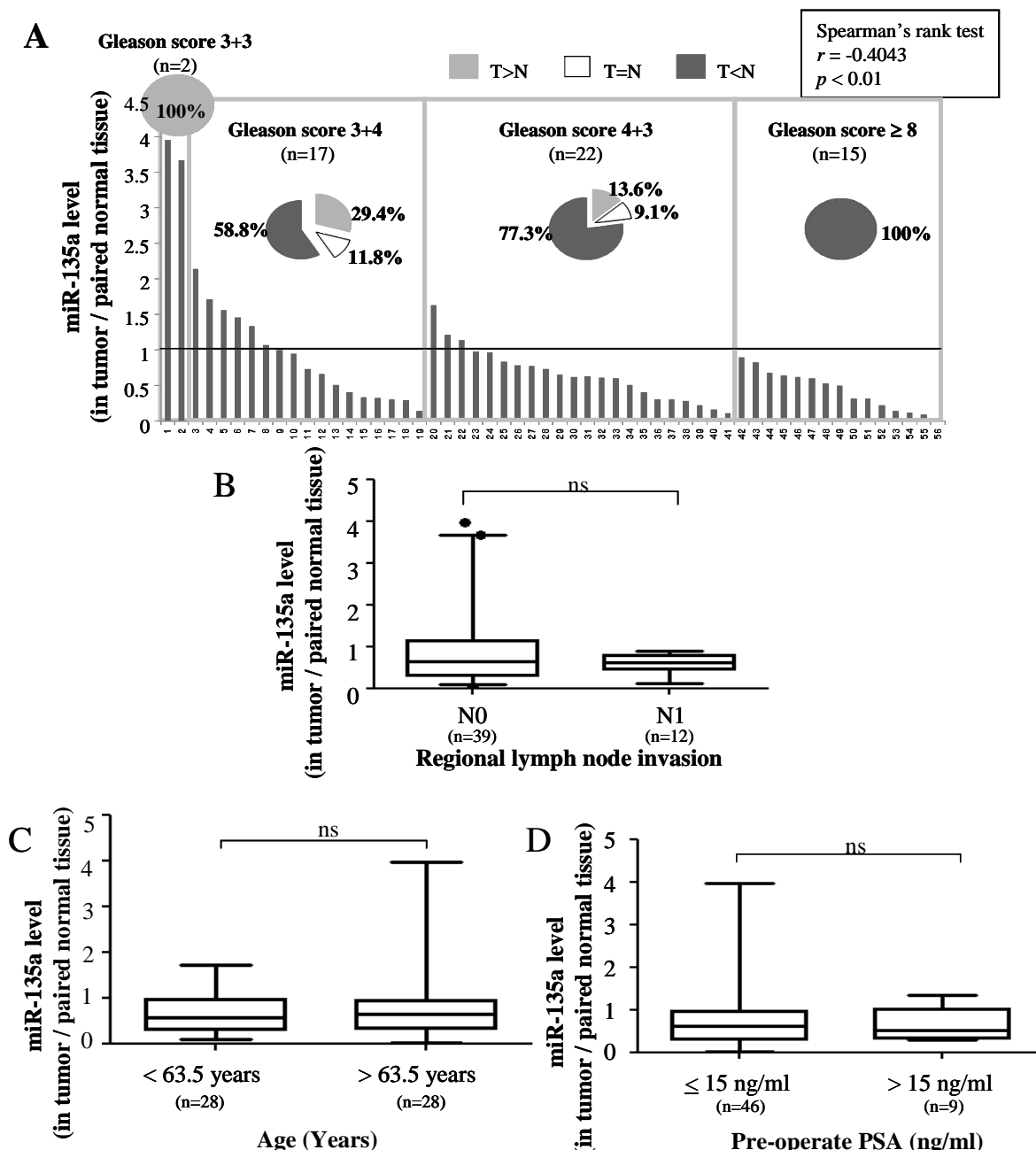


Supplementary Figure 4. Effect of miR-135a over-expression in cell migration and invasion abilities of HeLa cells.

HeLa cells were transfected with miR-135a or miR negative control (miR-NC). Two days later, cell migration and invasion assays were performed as described for PC-3 cells in material and methods.

A. Time-lapse microscopy analysis of cell migration. After transfection, cells were analyzed by videomicroscopy in wound healing assays. The speed of wound closure was expressed as percentage relative to the one in miR-NC transfected cells. Representative pictures of wound closure are presented (Bar = 100 μ m).

B. Cell invasion assay in cells transfected with miR-135a or miR-NC. Percentage of invasive cells was expressed as: (number of cells invading through Matrigel coated membrane/number of cells migrating through non-coated membrane) x 100. Representative pictures are presented (Bar = 100 μ m).



Supplementary Figure 5. miR-135a expression in prostate tissue and relationship with various clinicopathological features.

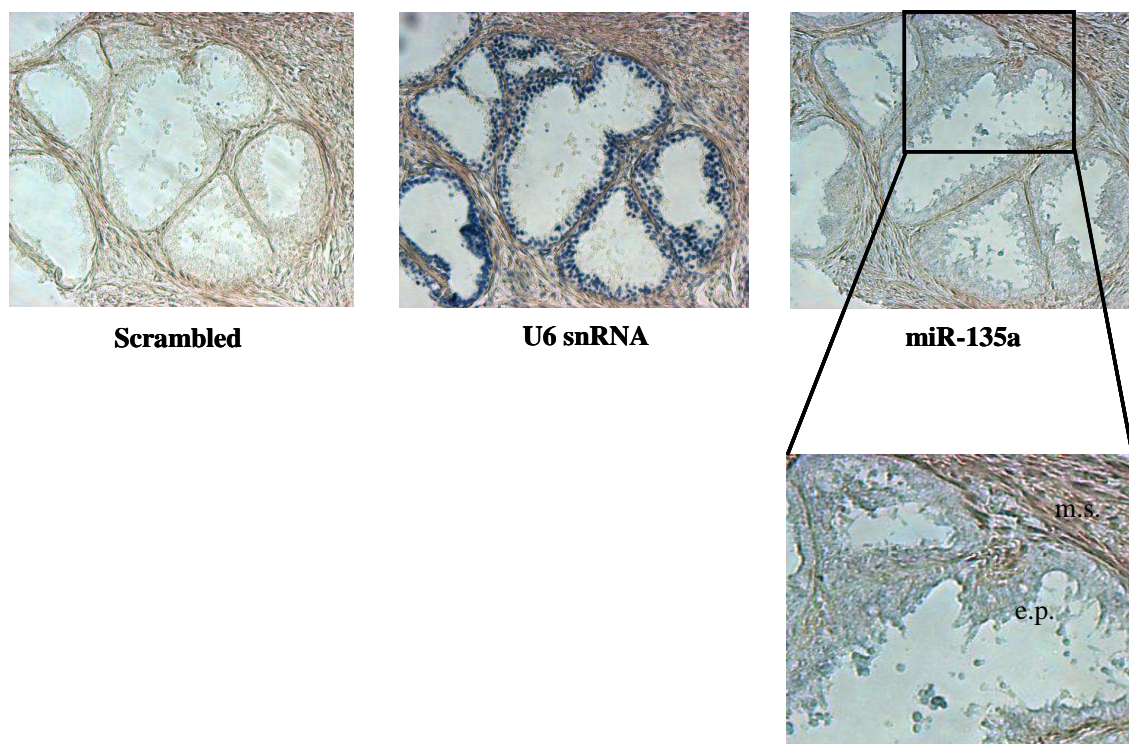
MiR-135a expression in cancerous and pair-matched adjacent non-cancerous tissues from prostatectomy was determined by RT-qPCR (n=56).

A. Correlation between miR-135a expression in prostate samples and the Gleason score. Numbers in ordinate refer to patients. Patients were ranked within four Gleason scores of PCa, according to the ratio of miR-135a expression in tumor relative to paired normal tissue from the same patient. Percentage of patients with miR-135a expression level higher, equal or lower in tumor tissue (T) than in paired normal counterpart (N) was calculated and represented respectively in grey (T>N), in white (T=N) and in black (T<N). The correlation coefficient value, referred as r and calculated by Spearman's rank test ($r = -0.4043$) was statistically significant (**, $p < 0.01$).

B. Relation between miR-135a expression in prostate samples, according to the ratio in tumor relative to paired normal tissue, and the regional lymph node invasion. N0, no distant metastasis in regional lymph nodes, $n = 39$; N1, presence of metastasis in regional lymph nodes, $n = 12$. ns, p -value non-significant by unpaired t test.

C. Relation between miR-135a expression in prostate samples, according to the ratio in tumor relative to paired normal tissue, and the age of patients. Samples were divided into 2 groups by setting a cut-off value at the median patient age; < 63.5 years, $n = 28$; > 63.5 years, $n = 28$. ns, p -value non-significant by unpaired t test.

D. Relation between miR-135a expression in prostate samples, according to the ratio in tumor relative to paired normal tissue, and the pre-operate PSA value. Samples were divided into 2 groups by setting a cut-off value at the median pre-operation PSA value; < 15 ng/ml, $n = 9$; ≥ 15 ng/ml, $n = 46$. ns, p -value non-significant by unpaired t test.



Supplementary Figure 6. Localization of miR-135a expression in human prostate tissue.

Representative images of *in situ* hybridization (ISH) staining in paraffin sections from human prostate tissue. Three sequential sections were hybridized either with scrambled (negative control), U6 snRNA (positive control) or miR-135a specific probes. Positive signal is given by a cytoplasmic or nuclear (for miR-135a or U6 probe, respectively) NBT/BCIP blue stain. e.p., epithelial cells of prostate glands ; m.s., muscular stroma.

Supplementary Table 1. Primer sequences for qPCR and for plasmid constructions.

Sequence of primers for qPCR

	Forward	Reverse
Pri-miR-135a1	GTTGGGGTGGGAAGAAGTG	GGCTCCAATCCCTATATGA
Pri-miR-135a2	GGTTAGCTTTGAAATGGTTG	TCCATCCCTACATGAGACTT
ROCK1	TACCAGCTGCAAGCTATATTAGA	TTCGAGATTATGTTTGAGATGC
ROCK2	ATCAAAGAGATGATGGCTAGAC	GCAAGATTGGCAACATCAC
Histone H4 promoter	AAATGGTGGGATCACAGACG	CGAGCTTCTTGTTTCCGTGT
TBP promoter	GTGGCGGTCCACATAAAAAAC	GTCCTCTCATGCCCTGTGTT
PSA AREIII	ACAGACCTACTCTGGAGGAAC	AAGACAGCAACACCTTTTT
miR-135a2 ARE-2	GGCCAGGTTGTAAAGCACT	CATCGGCCAGAACTCTTAGC

Sequence of primers for plasmid constructions

	Forward	Reverse
-1402/-22 miR-135a2	GGTACCAAGGAGAGATGTGGTAGA GG	GCTAGCTGGTCGGATGCAAACTT AT
-6762/-5522 miR-135a2	GGTACCAGCTGCTATTTTCATCATTT G	GCTAGCTAAGCCATCGGCCAGAAC TC
-8822/-7622 miR-135a2	GGTACCTCTACAGCATATGGCATTG C	GCTAGCCAGAATGAAGATTACTGA GGC
Construct with ARE-2 mutant	GGGTCTTGGTCAACAAGTAAAGCTT TTTCTCCTTCGTCATGG	CCATGACGAAGGAGAAAAAGCTTT ACTTGTGACCAAGACCC
3'UTR ROCK1	CCATGTGACTGAGTGCCCTG	AATGCAACCCCCATTGAAAG
3'UTR ROCK2	CTGCCTTCTATGAAAGCAGT	TCCTAAGAGCTGGTAAACGC

Supplementary Table 2. Clinicopathological features of samples from patients with prostate cancer.

N°	Age	Gleason	Stage	pN	Margin	PSA [ng/ml]
1.	67	3+3	pT2c	N0	R1	15
2.	72	3+3	pT2c	N0	R0	8.16
3.	66	3+4	pT2a	N0	R0	5.64
4.	60	3+4	pT3a	N0	R0	12.3
5.	60	3+4	pT3a	N0	R1	9.8
6.	51	3+4	pT3a	N0	R1	11
7.	66	3+4	pT3a	N0	R0	22
8.	62	3+4	pT2c	N0	R0	4.8
9.	49	3+4	pT2c	N0	R1	5
10.	63	3+4	pT2c	N0	R0	6.8
11.	65	3+4	pT2c	N0	R1	5.35
12.	70	3+4	pT3a	N0	R0	9.33
13.	73	3+4	pT2b	Nx	R1	6.1
14.	56	3+4	pT3a	N0	R1	3.83
15.	53	3+4	pT3a	N0	R1	5.3
16.	54	3+4	pT3a	N0	R0	6.6
17.	68	3+4	pT3a	N0	R1	15.45
18.	68	3+4	pT3a	Nx	R0	3.2
19.	60	3+4	pT2b	N0	R0	7.23
20.	61	4+3	pT2c	N0	R0	8.8
21.	67	4+3	pT3b	N0	R1	18
22.	65	4+3	pT3b	N0	R0	11.5
23.	57	4+3	pT2c	N0	R0	5.6
24.	64	4+3	pT2c	N0	R0	4.8
25.	60	4+3	pT3b	N1	R0	17
26.	66	4+3	pT2c	N0	R1	7.83
27.	69	4+3	pT3a	N0	R0	8.3
28.	60	4+3	pT3b	N1	R1	19.13
29.	61	4+3	pT3a	Nx	R1	8.1
30.	61	4+3	pT2c	N0	R0	4.04
31.	59	4+3	pT3a	N0	R1	13.1
32.	65	4+3	pT2c	Nx	R1	4.96
33.	69	4+3	pT3a	N1	R1	6.48
34.	75	4+3	pT3b	Nx	R0	3.23
35.	62	4+3	pT3b	N1	R0	197
36.	62	4+3	pT3a	N0	R0	13.3
37.	57	4+3	pT3a	N0	R0	26
38.	60	4+3	pT3b	N0	R0	10
39.	70	4+3	pT2c	N0	R0	5.42
40.	60	4+3	pT3b	N0	R1	7.7
41.	60	4+3	pT3b	N0	R1	12.7
42.	72	4+5	pT3a	N1	R0	6
43.	50	5+4	pT3a	N1	R1	8.96
44.	64	4+5	pT3a	N1	R1	13
45.	70	4+4	pT3a	N0	R0	6.33
46.	71	5+4	pT3a	N1	R1	8.9
47.	65	4+4	pT3a	N1	R1	3.36

N°	Age	Gleason	Stage	pN	Margin	PSA [ng/ml]
48.	44	4+5	pT3b	N0	R1	44
49.	58	4+4	pT3a	N1	R1	14
50.	74	4+5	pT3b	N0	R0	nd
51.	66	4+5	pT3b	N1	R1	16.8
52.	69	4+4	pT3a	N0	R1	10.6
53.	51	4+4	pT3b	N0	R0	10.51
54.	70	4+4	pT3b	N1	R1	4.35
55.	63	4+5	pT3a	N0	R1	4.6
56.	65	4+5	pT3b	N0	R1	13.3

The cases were all selected from Centre Hospitalier Lyon-Sud. Prostate tissue samples were obtained from 56 patients who underwent radical prostatectomy, between 2003 and 2012. A non-interventional biomedical research protocol for tissue samples conservation has been set-up with the approval of the Ethics Committee in Lyon (CPP Sud-Est 2; medical faculty and the state medical board) to these investigations. An informed consent was obtained for all patients included in these studies, prior to any tissue sample conservation and for research use.

Immediately after prostate removal (delay inferior to 10 min), small pieces of tissue (at least 6 tissue samples of 0.5 to 1 cc) were gross dissected by the pathologist (M.D.-P.), in the left and right peripheral zones, the transitional area and the seminal vesicles. All fragments were snapped frozen and stored in liquid nitrogen until analysis. To ensure the tissue was cancerous or non-cancerous and to confirm the Gleason score, histological analysis of a frozen section was performed for each sample by the same pathologist before any extraction. The fragments fully composed of tumor glands were selected and named “tumor tissue”. On the other hand, some samples containing non-tumor tissue were selected and named “normal tissue”.

pT2 pathological stages: primary tumor confined to prostate. pT2a, unilateral disease involving one-half of one lobe or less; pT2b, unilateral disease involving more than one-half

of lobe but not both lobes; pT2c, bilateral disease; pT3 pathological stages: extra-prostatic extension of the disease. pT3a, extra-prostatic extension; pT3b, seminal vesicle invasion.

N0, no distant metastasis in regional lymph nodes; N1, presence of metastasis in regional lymph nodes; Nx, regional lymph nodes not assessed.

R0, negative surgical resection margins; R1, positive surgical resection margins.

nd, PSA concentration not determined.

Supplementary Table 3. Pathological characteristics of samples from patients with prostate cancer.

	Overall (n=56)	Low ¹ (n=0)	Intermediate ² (n=16)	High ³ (n = 40)
Gleason score				
6	3.57 % (2)	0 % (0)	12.5 % (2)	0 % (0)
7 (3+4)	30.36 % (17)	0 % (0)	43.75 % (7)	25 % (10)
7 (4+3)	39.28 % (22)	0 % (0)	43.75 % (7)	37.5 % (15)
8-9	26.78 % (15)	0 % (0)	0 % (0)	37.5 % (15)
Pathological stage				
≤pT2a	1.79 % (1)	0 % (0)	6.25 % (1)	0 % (0)
pT2b	3.57 % (2)	0 % (0)	12.5 % (2)	0 % (0)
pT2c	23.21 % (13)	0 % (0)	81.25 % (13)	0 % (0)
pT3a	44.64 % (25)	0 % (0)	0 % (0)	62.5 % (25)
pT3b	26.79 % (15)	0 % (0)	0 % (0)	37.5 % (15)
Lymph node				
N0	69.64 % (39)	0 % (0)	87.5 % (14)	62.5 % (25)
N1	21.43 % (12)	0 % (0)	0 % (0)	30 % (12)
Nx	8.93 % (5)	0 % (0)	12.5 % (2)	7.5 % (3)
Surgical merges				
R0	48.21 % (27)	0 % (0)	62.5 % (10)	42.5 % (17)
R1	51.79 % (29)	0 % (0)	37.5 % (6)	57.5 % (23)

() are frequencies for parameters.

Risk classification:

¹ Low Risk: stage pT1 to pT2a; Gleason score ≤ 6; PSA < 10 ng/ml.

² Intermediate Risk: stage pT2b to pT2c; Gleason score of 7; 10 ng/ml < PSA < 20 ng/ml.

³ High Risk: stage ≥ pT3a; Gleason score ≥ 8; PSA > 20ng/ml.

Liste des publications, participations aux colloques et séminaires

Publication :

A. Kroiss, S. Vincent, M. Decaussin-Petrucci, E. Meugnier, A. Ruffion, F. Chalmel, J. Samarut and N. Allioli. **Androgen-regulated microRNA-135a decreases prostate cancer cell migration and invasion by down-regulating ROCK1 and ROCK2 protein expression.**

Submitted to Oncogene

Demande de Brevet Français:

Procédé de diagnostic et/ou de pronostic d'un cancer du système reproducteur mâle, en particulier du cancer de la prostate ou du cancer testiculaire.

Séminaires internationaux – Participation orales :

- Androgen 2010 – Leuven, Belgique – 25-26 Novembre 2010

Title: miR-135a, an androgen regulated microRNA which targets the ANXA7 tumor suppressor gene

Authors: Auriane Kroiss, Séverine Vincent, Jacques Samarut and Nathalie Allioli

- 20th Meeting of the ESUR – Strasbourg, France – 25-27 Octobre 2012

Title: Androgen regulated microRNA-135a directly targets oncogene ROCK-1 and decreases invasion ability in Prostate Cancer (PCa) cells.

Authors: Auriane Kroiss, Séverine Vincent, Myriam Decaussin-Petrucci, Alain Ruffion, Jacques Samarut and Nathalie Allioli

RESUME

La voie de signalisation des androgènes, à travers le récepteur aux androgènes (AR), joue un rôle important dans le développement et la fonction de la prostate, ainsi que dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate. La découverte de nouveaux effecteurs de la signalisation androgènes-AR permettra une meilleure compréhension de ces mécanismes.

MiR-135a a été identifié comme un gène cible de la voie de signalisation androgènes-AR. Après stimulation androgénique, AR active directement la transcription du gène miR-135a2, en se fixant sur un élément de réponse aux androgènes dans la région promotrice.

Une surexpression de miR-135a inhibe la migration et l'invasion de cellules prostatiques cancéreuses, en régulant négativement l'expression des protéines ROCK1 et ROCK2, deux gènes cibles de miR-135a nouvellement identifiés.

De plus, miR-135a cible et régule négativement l'expression du facteur de transcription FOXN3, capable de moduler l'activité transcriptionnelle de AR et la prolifération cellulaire dépendante des androgènes.

L'étude fonctionnelle de miR-135a suggère donc qu'il puisse être impliqué dans la progression du cancer de la prostate, en régulant la formation des métastases et la signalisation androgénique.

L'expression de miR-135a, dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain adjacent, de prostatectomies de patients, est inversement corrélée aux paramètres d'agressivité de la maladie, suggérant qu'il puisse être utilisé comme marqueur de pronostic du cancer de la prostate.

Ces résultats font de miR-135a un nouvel effecteur de la voie de signalisation de AR, pouvant contribuer à la progression du cancer de la prostate.

Mots clés : microARN, miR-135a, cancer de la prostate, récepteur aux androgènes, ROCK1, ROCK2, FOXN3.